

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



543193

(43) 国際公開日
2004年8月5日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/064857 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, 39/395, 45/00, 48/00,
A61P 5/38, 29/00, 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

(SEKI,Masako) [JP/JP]; 〒862-0959 熊本県 熊本市 白
山一丁目 1-2 5 Kumamoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010587

(74) 代理人: 水野 昭宣 (MIZUNO,Akinobu); 〒150-0044 東
京都 渋谷区 円山町 2 2 番 1 2 ライオンズマンショ
ン渋谷道玄坂 3 0 3 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003年8月21日 (21.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-016076 2003年1月24日 (24.01.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ガルファーマ (GALPHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
761-0301 香川県 高松市 林町 2 2 1 7 番地 4 4 香川
県新規産業創出支援センター ネクスト香川 2 0 3 号
Kagawa (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平島 光臣 (HI-
RASHIMA,Mitsuomi) [JP/JP]; 〒761-0322 香川県 高松
市 前田東町 5 0 5 番地 2 医大宿舎 B-4 0 4 Ka-
gawa (JP). 西 望 (NISHI,Nozomu) [JP/JP]; 〒761-0703
香川県 木田郡 三木町 大字 鹿伏 6 0 5 番地 1 0 Ka-
gawa (JP). 山内 清明 (YAMAUCHI,Akira) [JP/JP]; 〒
761-0113 香川県 高松市 屋島西町 1 9 2 7-5 Kagawa
(JP). 吉田 尚子 (YOSHIDA,Naoko) [JP/JP]; 〒760-0080
香川県 高松市 木太町 3 9 4 6 Kagawa (JP). 積 正子

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS CONTAINING GALECTIN 9

(54) 発明の名称: ガレクチン9含有医薬

(57) Abstract: Galectin 9 exerts various functions depending on its localizations. On the other hand, galectin 9 is expected as participating in various biological functions. Thus, it has been required to clarify the detailed biological activities of galectin 9 and develop galectin 9-related techniques including development of drugs. Human galectin 9 shows a cytotoxic activity and an apoptosis-inducing activity on tumor cells but shows neither cytotoxic activity nor apoptosis-inducing activity on normal cells. Therefore, it is possible to employ galectin 9 protein, a galectin 9 agonist, a galectin 9 antagonist, an anti-galectin 9 binding protein antibody, an anti-galectin 9 binding sugar chain antibody, a galectin 9-producing, releasing or inducing substance, etc. as an antitumor agent, an antiallergic agent, an immunosuppressant, a drug for autoimmune diseases, an antiinflammatory agent and an active ingredient as a substitute for corticosteroid hormone.

(57) 要約: ガレクチン9は、その局在によってそれぞれその機能が異なっている一方で、様々な生体機能への関与が予測され、その詳しい生物活性を解明して、医薬品の開発を含めガレクチン9関連技術開発をなすことが求められている。ヒトガレクチン9は腫瘍細胞に対して細胞傷害活性やアポトーシス誘導活性を示すが、正常細胞には傷害活性を示さず、さらにはアポトーシスを誘導しないことなどから、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9アゴニスト、ガレクチン9アンタゴニスト拮抗物質、抗ガレクチン9結合蛋白抗体、抗ガレクチン9結合糖鎖抗体、ガレクチン9産生・遊離誘導物質などを、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用活性成分剤として開発できる。

WO 2004/064857 A1

明 細 書

ガレクチン9含有医薬

技術分野

本発明は、ガレクチン9、特にヒトガレクチン9の悪性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性、悪性腫瘍細胞に対してのアポトーシス誘導活性、悪性腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性（抗ガン活性）、活性化T細胞のアポトーシス誘導活性、特にCD4陽性T細胞のアポトーシス誘導活性、免疫抑制活性、抗炎症作用、抗アレルギー作用を利用する技術に関する。本発明は、ガレクチン9並びにその関連技術を利用した抗腫瘍剤（抗ガン剤）、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用剤に関する。

背景技術

マウスにおいてガレクチン9は胸腺細胞のアポトーシスを惹起すること、またラットの脾細胞中のT細胞のアポトーシスを誘導する一方で、ガレクチン9はCD8陽性T細胞のアポトーシスを特異的に誘導するがCD4陽性T細胞のアポトーシスは誘導しないことが報告されている。また、他のガレクチン、例えばガレクチン1についても活性化T細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。一方、ガレクチン3はそれを遺伝子導入することでアポトーシスの抑制が見られることなどが知られている（以上、非特許文献1～4）。

本発明者等のグループはヒトT細胞由来好酸球遊走因子のクローニングに成功し、それによりそれがTureci等が報告したヒトガレクチン9（非特許文献5）のバリエーション、エカレクチンであることを見出した（非特許文献6）。さらに、本発明者等のグループはエカレクチンとガレクチン9は同一の物質であることを明らかにし、ヒトのガレクチン9はそのリンクペプチドの長さの違いにより、ショートタイプ、メディアムタイプ、ロングタイプの3種類があることを明らかにした（非特許文献7）。

アレルギーや自己免疫疾患はCD4 陽性Tリンパ球の過剰免疫反応により惹起される。難治性アレルギーや自己免疫疾患の治療には、ステロイドホルモンや免疫抑制剤が用いられる。しかしながら、ステロイドは副作用が強いことから、問題が多いし、また、これまで知られた免疫抑制剤にも副作用の点でそれが強いことから問題のあるものがある。

【非特許文献1】

Wada J. et al., J Clin Invest., 1997, 99: 2452-61

【非特許文献2】

Tsuchiyama Y. et al., Kidney Int., 2000, 58: 1941-52

【非特許文献3】

Perillo NL et al., Nature, Dec. 14, 1995, 378(6558): 736-9

【非特許文献4】

Matarrese P. et al., Int J Cancer., Feb. 15, 2000, 85(4): 545-54

【非特許文献5】

Tureci O. et al., J Biol Chem., Mar. 7, 1997, 272(10):6416-22

【非特許文献6】

Matsumoto R. et al., J Biol Chem., 1998, 273:16976-84

【非特許文献7】

Matsushita N. et al., J Biol Chem., 2000, 275:8355-60

生体内の生理活性物質は、これまで数多く見出されているが、それらの多くのものは、例えば腫瘍細胞などに作用すると同様に正常な細胞にも作用することから、必ずしもその一部の活性が解明されたからといってその医薬などへの利用が簡単に図れるものではない。

ガレクチン9は、 β -ガラクトシド結合レクチンであるガレクチンの仲間の一つである。ガレクチンは生物の発生・分化、細胞増殖、アポトーシス、細胞間接着、細胞と細胞外マトリックスの接着、及び遊走活性など多種多様な生物活性を示す。ガレクチン9は、ガレクチンの中でも種々の刺激によって、その産生・遊離が誘導される物質である一方、その産生と遊離は解離している。またガレクチ

ン9は、その局在、すなわち、細胞質、細胞膜、及び細胞外とのその存在場所によってそれぞれその機能が異なっていることも予測される。

そこで、ガレクチン9の詳しい生物活性を解明すること、そしてその解明に基づいた医薬品の開発を始めとしたガレクチン9関連技術開発が求められている。

発明の開示

ガレクチン9は、活性化Tリンパ球のアポトーシスを誘導する。さらに、ガレクチン9は、活性化CD4及びCD8陽性Tリンパ球のアポトーシスを誘導する。ところが、ガレクチン9は、活性化されていないTリンパ球のアポトーシスを誘導することはない。このガレクチン9によるアポトーシスに対しては、CD4陽性リンパ球がより感受性が高い。また、ガレクチン9によるアポトーシスは、カルシウム、カルパイン、カスパーゼ1、カスパーゼ3又はカスパーゼ7の経路によって誘導されることを見出すことに成功した。抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤として広く使用されている副腎皮質ステロイドホルモン（グルココルチコイド）と同様な経路でアポトーシスを誘起することから、ガレクチン9活性の発現は、副腎皮質ステロイドホルモンと同様な生物活性を期待できるとの認識に至り、本発明をなすに至った。

また、本発明者等は、ガレクチン9が腫瘍細胞に対して細胞障害活性を示すけれども、正常細胞に対しては細胞障害活性を示すようなことはないとか、腫瘍細胞、特に悪性腫瘍細胞あるいは転移性腫瘍細胞に対して特徴的な作用（例えば、転移抑制活性）を示してより好ましい結果を誘導するとか、あるいは腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対してはアポトーシスを誘導しないという現象を見出し、本発明をなすに至った。

本発明は、

- 〔1〕 (i) (a) ガレクチン9及びその類縁体、
- (b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
- (c) ガレクチン9産生及び遊離の誘導因子、

(d) 抗ガレクチン9受容体抗体、及び

(e) ガレクチン9結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする、

(ii) 抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用活性成分剤から成る群から選ばれた医薬又は動物薬；

〔2〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗腫瘍剤；

〔3〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤；

〔4〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫抑制剤；

〔5〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする自己免疫疾患用剤；

〔6〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗炎症剤；

〔7〕 ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする副腎皮質ステロイドホルモン代替剤；

〔8〕 (a) ガレクチン9及びその類縁体、及び(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする悪性細胞傷害剤；及び

〔9〕 (a) ガレクチン9及びその類縁体、及び(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とするガン転移抑制剤；

〔10〕 (i) (a) ガレクチン9及びその類縁体、
(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、

- (c) ガレクチン 9 産生及び遊離の誘導因子、
- (d) 抗ガレクチン 9 受容体抗体、及び
- (e) ガレクチン 9 結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示す薬剤；

- [1 1] (i) (a) ガレクチン 9 及びその類縁体、
- (b) ガレクチン 9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
 - (c) ガレクチン 9 産生及び遊離の誘導因子、
 - (d) 抗ガレクチン 9 受容体抗体、及び
 - (e) ガレクチン 9 結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導する薬剤；

- [1 2] (i) (a) ガレクチン 9 及びその類縁体、
- (b) ガレクチン 9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
 - (c) ガレクチン 9 産生及び遊離の誘導因子、
 - (d) 抗ガレクチン 9 受容体抗体、及び
 - (e) ガレクチン 9 結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする免疫細胞、例えば活性化 T 細胞に対してアポトーシスを誘導する薬剤；

- [1 3] (i) (a) ガレクチン 9 及びその類縁体、
- (b) ガレクチン 9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
 - (c) ガレクチン 9 産生及び遊離の誘導因子、
 - (d) 抗ガレクチン 9 受容体抗体、及び
 - (e) ガレクチン 9 結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする活性化 T 細胞に起因する疾患あるいは病的症状の予防及び／又は治療剤；

〔14〕 活性化T細胞に起因する疾患が、アレルギー、自己免疫疾患、移植片に対する拒絶反応及び炎症から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔13〕記載の予防及び／又は治療剤；

〔15〕 4F2 heavy chain antigen (177216); ATPase, Na⁺ /K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (21361181); sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2 truncated isoform (15004317); stromal cell derived factor receptor 1 isoform a (9257240); stromal cell derived factor receptor 1 isoform b; heat shock 90kDa protein 1, beta (20149594); heat shock 90kDa protein 1, alpha; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (16507237); heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 (24234686); heat shock 70kDa protein 9B precursor (24234688); fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3 (27469830); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4826856); S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (21361647); programmed cell death 8 isoform 1 (4757732); 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (129379); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle (4757810); ribophorin II precursor (88567); farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (4758350); Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (21903482); dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (21104416); calcium-binding transporter (6841066); NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S protein 2 precursor (3540239); actin, beta (14250401); translation elongation factor EF-Tu-like protein P43 precursor, mitochondrial (7443384); metaxin 1 (4505281); sideroflexin 1 (23618867); TCR beta chain (2982508); Hnrnp A1 (2194069); phosphate carrier precursor isoform 1b (4505775); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 (4885079); voltage-dependent anion channel 1 (4507879); hyaluronan-binding protein precursor (8699626); androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 (20070798); solute carrier family 25 (mitoc

hondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11 (21361114); 3-hydroxy butyrate dehydrogenase precursor (17738292); B-cell receptor associated protein (1673514); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (4502303); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d (5453559); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 (21361565); small GTP-binding protein (13569962); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4505371); vesicle trafficking protein sec22b (4759086); mitochondrial import receptor Tom22 (9910382); signal sequence receptor, delta (5454090); ATP synthase, alpha chain (114517 or P25705); ATP synthase, beta chain (114549 or P06576); Sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain (1703470 or P54709); ADP, ATP carrier protein (113463, P12236, 113459, P05141, 113455 or P12235); ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 1 (731047 or P31930)及びCytochrome c oxidase polypeptide II (117020 or P00403)から成る群から選ばれたものであることを特徴とするガレクチン9結合因子〔括弧内の数字は、NCBIのインターネットホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)にてその数字を入力することにより、タンパク質情報並びにそれをコードするDNAなどの核酸配列の情報を得ることができる、データベース上の同定番号をさす〕；及び

〔16〕 上記〔15〕記載のガレクチン9結合因子とガレクチン9との間の相互作用を利用したガレクチン9活性制御技術を提供する。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考

文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

図面の簡単な説明

図1は、(A) rGal-9のアポトーシス誘導活性についてPI法でフローサイトメトリー測定した結果を示す。(B) rGal-9のアポトーシス誘導活性についてAnnexin V 法でフローサイトメトリー測定した結果を示す。データは4回の実験のうちの代表例を示す。

図2は、rGal-9のアポトーシス誘導活性についてラクトース又はシュクロース存在下あるいは非存在下で測定した結果を示す。データは4回の実験のものの平均値±SEMである。

図3は、各種細胞株に対するrGal-9のアポトーシス誘導活性についてPI法でフローサイトメトリー測定した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図4は、末梢血由来T細胞に対するrGal-9のアポトーシス誘導活性についてPI法でフローサイトメトリー測定した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図5は、各種カスパーゼ阻害剤存在下Gal-9 誘起アポトーシスに対する阻害効果について実験した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図6は、濃度の異なる、パンカスパーゼ阻害剤又はカスパーゼ-1阻害剤存在下Gal-9 誘起アポトーシスに対する阻害効果について実験した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図7は、濃度の異なる、カルパイン阻害剤存在下Gal-9 誘起アポトーシスに対する阻害効果について実験した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図8は、Gal-9 誘起アポトーシスを受ける細胞を使用してのカルシウム流入に対するGal-9 の影響を実験した結果を示す。データは3回の実験のものの平均値±SEMである。

図9は、DEX、抗Fas 抗体及びエトポシドにより誘導されるアポトーシスに及ぼすGal-9 の作用効果について調べる実験をした結果を示す。データは4回の実験のものの平均値±SEMである。

図10は、悪性メラノーマ細胞MM-RUに対するガレクチン9のアポトーシス誘導活性についてPI法でフローサイトメトリー測定した結果を示す。

図11は、ヒトメラノーマ細胞株のうち、MM-BP とMM-RU からメッセンジャーRNA を採取し、RT-PCR法でガレクチンのDNA 量を解析した結果を示す電気泳動写真を示す。

図12は、胞巣形成性の細胞である乳ガン細胞株MCF-7とそれから新たに樹立した明らかな胞巣形成性を示さないMCF-7 K-10株の細胞の形態を示す写真である。

図13は、胞巣形成性の細胞であるMCF-7 K-4株と新たに樹立された明らかな胞巣形成性を示さないMCF-7 K-10株につきガレクチン9をウェスタンブロット法で調べた結果を示す電気泳動写真を示す。

図14は、組換えガレクチン9を外からメラノーマ細胞株MM-RUに添加し、ガレクチン9の作用効果について検討を行った結果を示す細胞の形態の写真である。

図15は、乳ガン細胞株より樹立されたMCF-7 K-10株にガレクチン9遺伝子を導入した場合の作用効果について検討を行った結果を示す細胞の形態の写真である。

図16は、MOLT4 由来のタンパク質のうちガレクチン9CT カラム吸着タンパク質の電気泳動写真を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ヒトガレクチン9が腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示すが、正常細胞には傷害活性を示さず、さらには腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しないことを見出してなされたものである。かくして、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9アゴニスト、ガレクチン9アンタゴニスト拮抗物質、抗ガレクチン9結合蛋白抗体、抗ガレクチン9結合

糖鎖抗体、ガレクチン9産生・遊離誘導物質などを、正常細胞には作用しない、腫瘍細胞に傷害活性を示し、アポトーシスを誘導する抗腫瘍剤（抗ガン剤）として利用する途を示すものである。さらに、本発明は、ヒトガレクチン9が転移性の悪性細胞に対して凝集誘導的に作用し、ガンなどの悪性腫瘍の転移抑制活性を有することを利用した、ガン転移抑制技術、例えばガレクチン9タンパクあるいはその誘導体、またはガレクチン9遺伝子導入やガレクチン9の産生・遊離を誘導することによる、ガン転移抑制作用を得るための方法、それに使用する試薬、あるいはキット、システム（検知・測定系を含む）などを提供する。

本発明は、ヒトガレクチン9が非活性化（レスティング）T細胞、特にCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）のアポトーシス誘導はそれを誘導しないし、レスティング CD8陽性T細胞（サブプレッサーT細胞や細胞傷害性T細胞）のアポトーシスは軽度誘導する一方で、ヒトガレクチン9がCD3で活性化したCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）のアポトーシス誘導を著明に誘導し、活性化CD8陽性T細胞（サブプレッサーT細胞や細胞傷害性T細胞）のアポトーシスもガレクチン1やガレクチン3よりも強く誘導することに基づいてなされている。

ヒトガレクチン3は外から加えた場合は活性化したCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）及びCD8陽性T細胞（サブプレッサーT細胞や細胞傷害性T細胞）のアポトーシスを誘導する。また、ガレクチン9によるアポトーシス誘導は濃度依存性、時間依存性にそれが見られる。CD4陽性T細胞は免疫反応を惹起するのに非常に重要な作用を示すことが知られており、CD4陽性T細胞の過剰反応により種々の自己免疫疾患やアレルギーが惹起されることが考えられる。

以上のことから、特にヒトガレクチン9は活性化したCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）に対しより顕著にアポトーシスを誘導したことから、ガレクチン、特にガレクチン9タンパク、またはガレクチン9遺伝子導入やガレクチン9の産生・遊離を誘導することにより、CD4陽性T細胞のアポトーシスを誘導し、その結果、免疫抑制効果や抗炎症効果を示すことができると考えられる。これら技術を利用して自己免疫疾患やアレルギー疾患、さらには抗炎症薬として用いることが可能となる。また、上記T細胞などは免疫細胞であることから、ガレクチン9は免

疫細胞に対してアポトーシスを誘導する活性を示すものである。

〔ガレクチン9によるアポトーシス誘導経路の解明〕

アポトーシスは種々の物質、たとえば免疫抑制剤として用いられるグルココルチコイド、Fasリガンドや抗Fas抗体等により惹起される。本発明では、ガレクチン9によるアポトーシスがどのような経路で誘導されるかの解明に成功している。すなわち、まず、ヒト末梢血T細胞の代わりにT細胞株であるJurkat細胞やMOLT4細胞を用い、ガレクチン9がプロピジウムアイオダイド(PI)法及びAnnexin V法にてこれらの細胞にアポトーシスを誘導することが明らかにされた。次にガレクチン9によるアポトーシスの誘導はラクトースで抑制されたが、シュクロースでは抑制されなかったことから、ガレクチン9のベータガラクトシド結合活性がアポトーシスの誘導に必要であることが解明された。

さらに、本発明に従い、ガレクチン9誘導アポトーシスにカスパーゼが関与しているかを検討した結果、パンカスパーゼインヒビターはデキサメサゾン、抗Fas抗体、TNF- α 、C2セラミドによるアポトーシスを抑制するとともに、ガレクチン9によるアポトーシスも、濃度依存性、時間依存性に抑制した。さらにその上流にあるカスパーゼ1、8、9、10に対する抑制剤について検討した。カスパーゼ1抑制剤、カスパーゼ8抑制剤、カスパーゼ9抑制剤、カスパーゼ10抑制剤が用いられた。その結果、ガレクチン9によるアポトーシスはカスパーゼ1特異的抑制剤によって抑制されたが、他のカスパーゼ特異的抑制剤によっては抑制されなかった。また、デキサメサゾン誘導アポトーシスは同様にカスパーゼ1抑制剤で、いっぽう抗Fas抗体やTNF- α のそれはカスパーゼ8及び10抑制剤で、C2セラミドのそれはカスパーゼ9の抑制剤で抑制された。このことからガレクチン9はデキサメサゾンと同様の経路でアポトーシスを誘導していると考えられた。

さて、カスパーゼ1の活性化にはカルパインの活性化が先行することが知られている。そこでカルパイン阻害剤がガレクチン9誘導アポトーシスに与える影響について検討した。その結果、カルパイン阻害剤は濃度依存性にガレクチン9誘

導アポトーシスを抑制した。さらにカルパインの活性化の前に細胞内へのカルシウム流入が見られることから、ガレクチン9刺激によってカルシウム流入が惹起されるか検討したところ、ガレクチン9は明らかなカルシウムの細胞内流入を誘導する。さらにその流入はラクトースで抑制されるが、シュクロースでは抑制されなかった。これらの結果からガレクチン9によるカルシウム流入にはベータガラクトシド結合活性が必須であることが示された。これまでの結果からガレクチン9はグルココルチコイド（デキサメサゾン）と同様の経路、すなわち、受容体→カルシウム流入→カルパイン→カスパーゼ1→カスパーゼ3及び7という経路でアポトーシスを誘導すると考えられる。

さらに、デキサメサゾン、抗Fas抗体、エトポシド(etoposide)によるアポトーシスに対するガレクチン9の効果を検討した結果、抗Fas抗体やエトポシドによるアポトーシスに対してガレクチン9は相加的な効果を示すが、一方、デキサメサゾンによるアポトーシスではガレクチン9による相加効果は見られなかった。好酸球のアポトーシスではガレクチン9はデキサメサゾンによるアポトーシスを逆に抑制することが明らかにされている。かくして、ガレクチン9とグルココルチコイドは同様の経路によってアポトーシスを誘導していることが強く示唆される。以上から、本発明において、ガレクチン9が抗炎症薬、抗アレルギー剤や免疫抑制薬として使用できる可能性が高いことが明らかにされた。ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9遺伝子導入やガレクチン9を誘導することにより副作用の少ない免疫抑制剤として用いること、またはそれを併用することでグルココルチコイド等の用量を減ずる結果、副作用を少なくすることもできる。

現在、グルココルチコイドが抗炎症薬、抗アレルギー剤や免疫抑制薬として広く用いられているし、難治性のアレルギーにFK506等の免疫抑制剤が用いられている。欠点としてはこれらの薬剤は重篤な副作用が多いことが知られている。しかしながら、これまでの結果からガレクチン9を上記グルココルチコイドが担う生物活性に代わるもの、あるいはそれと同等以上の優れた生物活性を担うものとして利用することができることが示されている。ガレクチン9、その類縁体など

の利用、ガレクチン9の生体内濃度、あるいは発現をコントロールすることで、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用活性成分剤を提供できる。また、ガレクチン9を利用して、グルココルチコイドの示す薬理作用・生物活性を利用した分野への応用が可能である。

アレルギーや自己免疫疾患はCD4陽性Tリンパ球の過剰免疫反応により惹起されるし、難治性アレルギーや自己免疫疾患の治療にはステロイドや免疫抑制剤が用いられることから、上記よりガレクチン9は、免疫抑制作用、抗炎症作用、抗アレルギーを示すことは明らかであり、ステロイドや免疫抑制剤の代わりに、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9遺伝子導入、ガレクチン9産生又は遊離誘導因子、抗ガレクチン9受容体抗体、ガレクチン9結合糖鎖に対する抗体などを抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替剤として利用する途を示すものである。

本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸を単離・配列決定したり、組換え体を作製したり、所定のペプチドを得ることができる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術（組換えDNA技術を含む）としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., “DNA Cloning”, 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸 III (組換えDNA技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., “Methods in Enzymology”, Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., “Methods in Enzymology”, Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., “Methods in Enzymology”, Vol. 1

53 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. W u et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306, Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）〔以下、これら全てを「遺伝子組換え技術」という〕。

本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出することができる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, New York, (1991) 等）。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), Guide to Huge Computers, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lip

man, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) 等に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータプログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータプログラム法としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことに鑑み、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を通常意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、天然型アミノ酸（天然に存在しているアミノ酸：あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸）と称されるアミノ酸以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変（あるいは修飾）されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変（修飾）できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えられる改変（修飾）については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されて

おり、これらは当業者に周知である。幾つかのとりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばアルキル化、アシル化、エステル化、アミド化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、リン酸化、グルタミン酸残基の γ -カルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B. C. Johnson (Ed.), *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp.1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", *Methods in Enzymology*, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663: p. 48-62 (1992)等の記載を参照できる。

本明細書中、ガレクチン9としては典型的には天然型ガレクチン9が挙げられる。天然型ガレクチン9としては、現在、ロングタイプ (L 型) ガレクチン9、ミディアムタイプ (M 型) ガレクチン9及びショートタイプ (S 型) ガレクチン9が報告されているが、L 型ガレクチン9はWO 02/37114 A1に開示の配列番号4の推定リンクペプチド領域により N端ドメインと C端ドメインとが連結されたものの、M 型ガレクチン9は該WO 02/37114 A1の配列番号5 の推定リンクペプチド領域により N端ドメインと C端ドメインとが連結されたもの、そしてS 型ガレクチン9は該WO 02/37114 A1の配列番号6 の推定リンクペプチド領域により N端ドメインと C端ドメインとが連結されたものであると考えられており、M 型ガレクチン9ではL 型ガレクチン9の当該リンクペプチド領域より該WO 02/37114 A1の配列番号7 の配列のアミノ酸残基が欠失している点でL 型ガレクチン9と異なること、そしてS 型ガレクチン9ではM 型ガレクチン9の当該リンクペプチド領域より該WO 02/37114 A1の配列番号8 の配列のアミノ酸残基が欠失している点でM 型ガレクチン9と異なること、すなわちS 型ガレクチン9ではL 型ガレクチン9推定リンクペプチド領域より該WO 02/37114 A1の配列番号9 のアミノ酸残基が欠失している点でL 型ガレクチン9と異なる。

本明細書において、ガレクチン9としては、上記L型ガレクチン9、M型ガレクチン9及びS型ガレクチン9、その他、それらガレクチン9ファミリーの天然に生ずる変異体、さらにそれらに人工的な変異（すなわち、一個以上のアミノ酸残基において、欠失、付加、修飾、挿入など）を施したものあるいはそれらの一部のドメインや一部のペプチドフラグメントを含むものを意味してよい。

本発明の代表的なガレクチン9タンパク質としては、WO 02/37114 A1の配列表の配列番号:1~3(SEQ ID NO:1~3)のいずれかのアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:1, 2又は3のアミノ酸配列のうちの少なくとも5~311, 5~323 又は5~355個の連続したアミノ酸残基を有し且つ同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:1, 2又は3のうちのいずれかの各ドメインのいずれか一つと少なくとも50%より高い相同性、あるいは少なくとも60%より高い相同性、あるいは少なくとも70%より高い相同性、あるいは少なくとも80%より高い相同性、あるいは少なくとも90%より高い相同性、あるいは少なくとも95%以上の相同性、あるいは少なくとも98%以上の相同性を有するものなどが挙げられる。

本発明のヒトガレクチン9ポリペプチドとしては、WO 02/37114 A1の配列表のSEQ ID NO:1~3のいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含む連続したアミノ酸残基、あるいは該SEQ ID NO:1, 2及び3のアミノ酸配列のうちの連続したアミノ酸残基5個以上、好ましくは10個以上、また好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、より好ましくは40個以上、また好ましくは50個以上、さらに好ましくは60個以上、もっと好ましくは70個以上、また好ましくは80個以上、さらに好ましくは90個以上、もっとも好ましくは100個以上、また好ましくは110個以上を有するものが挙げられる。本発明のヒトガレクチン9関連ポリペプチドとしては、該SEQ ID NO:1, 2及び3から成る群から選ばれたアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい（開始コドンに対応するMetを欠いていてもよい）。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

ガレクチン9あるいはその構成ドメイン、そのフラグメントをコードする核酸としては、ガレクチン9と同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。該ガレクチン9をコードする核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNA ハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNA ライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。該ガレクチン9をコードする核酸の塩基配列は、修飾（例えば、付加、除去、置換など）されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。また、天然に生ずる変異体であってもよい。それら核酸は、L型、M型又はS型ガレクチン9ペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件でWO 02/37114 A1に開示の配列表の配列番号：1のアミノ酸配列をコードする塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、該ガレクチン9と実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものあるいはその相補鎖などが挙げられる。

当該ガレクチン9をコードする核酸は、代表的にはWO 02/37114 A1に開示の配列表のSEQ ID NO:1～3のいずれかで表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの（各特徴的なドメインのみをコードするものも包含する）、コード配列に開始コドン（Metをコードするコドン）及び終止コドンを付加したもの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも50%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ該SEQ ID NO:1～3のアミノ酸配列のうちの少なくとも特徴的な連続したアミノ酸残基を有し、尚且つ同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。

本明細書中、「ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(polymerase chain re

action)」又は「PCR」とは、一般的に、米国特許第 4,683,195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR 法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる 2 個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR 法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用することができる。5' 端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また 3' 端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することが好ましい。プライマーは、好ましくは 5 個以上の塩基、さらに好ましくは 10 個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは 18~25 個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。

PCR 反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988 ; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990)); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR 法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

PCR 反応は、代表的な場合には、例えば鋳型（例えば、mRNAを鋳型にして合成されたDNA; 1st strand DNA）と該遺伝子に基づいてデザインされたプライマーとを、10×反応緩衝液（Taq DNA ポリメラーゼに添付されている）、dNTPs（デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物）、Taq DNA ポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetus社などの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCR サイクル条件下にそのサイクルを25～60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCR サイクル条件としては、例えば、変性90～95℃ 5～100 秒、アニーリング40～60℃ 5～150 秒、伸長65～75℃ 30 ～300 秒のサイクル、好ましくは変性 94 °C 15 秒、アニーリング 58 °C 15 秒、伸長 72 °C 45 秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR 産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNA とのハイブリッドのT_m値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1 分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 28, p. 716-734 (1989) に記載されているような既知の方法、例えば、フォスフォトリエステルの法、フォスフォジエステルの法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法、フォスフォネート法などの方法により化学合成されることができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有していてよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有していてよ

いし、場合によっては、マーカーの付された塩基を含有してよい。

所定の核酸を同定したりするには、ハイブリダイゼーション技術を利用することができる。該ハイブリダイゼーションは、上記「遺伝子組換え技術」を開示する文献記載の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、DNA などの核酸を含有しているサンプルをナイロンフィルターなどの膜を含めた担体に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その担体（例えば、膜など）に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA 断片と、ハイブリダイゼーション用緩衝液中で反応させて行われる。

ハイブリダイゼーション処理は、普通約35～約80℃、より好適には約50～約65℃で、約15分間～約36時間、より好適には約1～約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55℃で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham社) などを用いることができる。転写した担体（例えば、膜など）の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また担体（例えば、膜など）の固定化処理としては、普通約40～約100℃、より好適には約70～約90℃で、約15分間～約24時間、より好適には約1～約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターなどの担体を約80℃で約2時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した担体（例えば、膜など）の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有 50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜を含めた担体としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができる。

上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用される

ものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOH および1.5M NaCl を含有する液などを挙げる事ができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl 含有 0.5M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0などを挙げる事ができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM NaH_2PO_4 および2mM EDTA)などを挙げる事ができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した担体（例えば、膜など）はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% formamide、5×Denhardt's溶液 (0.2 %ウシ血清アルブミン、0.2 % polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1 % SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ 熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35～約50℃、好ましくは約42℃で、約4～約24時間、好ましくは約6～約8時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA断片の変性は、例えば、約70～約100℃、好ましくは約100℃で、約1～約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85℃、好ましくは約50～約70℃、より好ましくは約60～約65℃の条件を示す。

ハイブリダイゼーション完了後、フィルターなどの担体を十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA断片以外の標識プローブを取り除くなどしてから検出処理をすることができる。フィルターなどの担体の洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1 % SDS含有 0.5×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸)溶液などで洗うことにより実施できる。

ハイブリダイズした核酸は、代表的にはオートラジオグラフィーにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択して検出に用い

することもできる。検出したシグナルに相当する核酸バンドを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液(100mM NaCl および10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5)などに懸濁し、ついでこの懸濁液を適度に希釈して、所定の核酸を単離・精製、そしてさらなる増幅処理にかけることができる。本明細書で「高い相同性」といった場合当該対象配列の長さにもよるが、例えば 50%以上、さらには60% 以上、好ましくは70% 以上、さらに好ましくは80% 以上、そして特定の場合には95% 以上で、特に好ましくは97% 以上であってよい。該「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で問題の配列を有するものにハイブリダイズするものであってよく、例えば当該塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該ポリペプチドと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。

ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどを含めた核酸サンプルから目的核酸をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。クローニングされているヒト由来のcDNAライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞（特には、ヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、神経細胞、網膜、網膜血管細胞、網膜神経細胞、胸腺、血管、内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液細胞、マクロファージ、リンパ球、精巢、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、歯肉関連細胞、皮膚関連細胞、糸球体細胞、尿細管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞、さらには各種腫瘍組織、ガン細胞等）cDNAライブラリーを使用できる。さらに鋳型などとして用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene社、Invitrogen社、Clontech社などから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、ヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトP1 artificial chromosome ゲノミックライブラリー(Human Genome Mapping Resource Center)、ヒト組織cDNAライブラリー

(例えば、Clontech社などから入手可能)を用いることができる。種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトゲノミック DNAライブラリーあるいはヒト由来cDNAライブラリーをプローブを使用してスクリーニングできる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライム DNAラベリングキット (Boehringer Mannheim社) などを使用し行うことができる。例えば、random-primingキット (Pharmacia LKB社, Uppsala) などを使用して、プローブ用DNA を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham社) などとで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。

所定の核酸を保有する、ファージ粒子、組換えプラスミド、組換えベクターなどは、当該分野で普通に使用される方法でそれを精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法 (Molecular Cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989)、電気泳動法などにより精製することができる。ファージ粒子などからは、当該分野で普通に使用される方法でDNA を精製分離することができ、例えば、得られたファージなどをTM溶液 (10mM MgSO_4 含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8) などに懸濁し、DNase I およびRNase A などで処理後、20mM EDTA、50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K 及び0.5 %SDS 混合液などを加え、約65°C、約1 時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNA を沈殿させ、次に得られたDNA を70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液 (10mM EDTA 含有10mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0) に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNA は、サブクロニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクロニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクロニングにより得られたDNA も、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

本明細書において、得られたPCR産物などの核酸(DNAを含む)は、通常 1~2% アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例

例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いて抽出する。抽出されたDNA は適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5' 末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18 などのpUC 系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピテント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR 産物はその塩基配列を解析される。PCR 産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech社), pCR-Script™ SK(+) (Stratagene社), pGEM-T (Promega社), pAmp™ (Gibco-BRL社) などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。宿主細胞の形質転換をするには、例えばファージベクターを使用したり、カルシウム法、ルビジウム／カルシウム法、カルシウム／マンガン法、TFB 高効率法、FS B 凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる (D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983 など)。目的とするDNA を単離するためには、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends) を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pp.28-38, Academic Press, New York (1990) などに記載された方法に従って行うことができる。

DNA は、必要に応じてクローニングでき、例えば、プラスミド、λファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YAC などが利用できる。好ましくはλファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、λgt10、λgt11、λDASHII、λFIXII、λEMBL3、λZAPII™ (Stratagene社) などが利用できる。また、得られたDNA を、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組み込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO 細胞、COS 細胞などで発現させることができる。また、該DNA 断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA 断片として、または適当なベクターに組み込み、そして動物に導入して、所定の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成することができ

る。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。所定の遺伝子産物の確認を、当該外来遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。

外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., *Virology*, 52: 456, 1973など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D. Warden et al., *J. Gen. Virol.*, 3: 371, 1968など）、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., *EMBO J.*, 1: 841, 1982 など）、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

所定の遺伝子など（本発明で得られたDNA など）を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。もちろん、市販のキットや試薬に添付のものから選んで使用することもできる。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(trp)、ラクトースプロモーター(lac)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(tac)、リポプロテインプロ

モーター(1pp)、 λ ファージ P_L プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTR プロモーター、CMV プロモーター、SR α プロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10 プロモーター等を使用し得る。さらにCYC1, HIS3, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TP1, AOX1等の制御系を使用することもできる。

所望ポリペプチドをコードするDNA のトランスクリプションを促進するためエンハンサーをベクターに挿入することができ、そうしたエンハンサーとしてはプロモーターに働いてトランスクリプションを促進する作用を持つ、通常約10~100 bpの cis作用を持つエレメントのものが挙げられる。多くのエンハンサーが、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、インシュリンなどの哺乳動物遺伝子から知られている。代表的には、真核細胞感染性ウイルスから得られるエンハンサーが好適に使用でき、例えばレプリケーションオリジンのレート領域にあるSV40エンハンサー (100-270 bp)、 サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、 ポリオーマのレプリケーションオリジンのレート領域にあるエンハンサー、 アデノウイルスのエンハンサーなどの例が挙げられる。また、必要に応じて、宿主にあったシグナル配列を付加することもでき、それらは当業者によく知られているものを使用できる。

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18, pUC19, pUC18, pUC119, pSP64, pSP65, pTZ-18R/-18U, pTZ-19R/-19U, pGEM-3, pGEM-4, pGEM-3Z, pGEM-4Z, pGEM-5Zf(-), pBluescript KS™ (Stratagene社) などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、例えばpAS, pKK 223 (Pharmacia社), pMC1403, pMC931, pKC30, pRSET-B (Invitrogen社) なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、例えばSV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、具体的にはpcD, pcD-SR α , CDM8, pCEV4, pME18S, pBC12BI, pSG5 (Stratagene社) などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミ

ドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12 株に由来するものが挙げられ、例えばNM533, XL1-Blue, C600, DH1, DH5, DH11S, DH12S, DH5 α , DH10B, HB101, MC1061, JM109, STBL2, B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿主細胞が酵母の場合、例えば *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces* 株, *Candida*, *Trichoderma reesei*, その他の酵母株などが挙げられる。

宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、ヒト腎細胞由来293細胞、ヒト表皮細胞由来A431細胞、ヒト結腸由来205細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR⁻細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3細胞、マウスL細胞、9BHK、HL60、U937、HaK、Jurkat細胞、その他の形質転換されて得られたセルライン、通常の二倍体細胞、インビトロの一次培養組織から誘導された細胞株などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus)、それに由来するものあるいはその他の適切なものをベクターとし、*Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる (例えば、Luckow et al., *Bio/Technology*, 6, 47-55 (1988); Setlow, J. K. et al. (eds.), *Genetic Engineering*, Vol. 8, pp.277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda et al., *Nature*, 315, pp.592-594 (1985))。 *Agrobacterium tumefaciens*などを利用して、植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメ

ラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNA リガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 13: r165, 1985; S. Linn et al. ed. *Nucleases*, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.*, 19: Suppl. 2077, 1991などに記載のものが挙げられる。

本発明に従い、ポリペプチド（又はタンパク質）をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX 濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5～約8が望ましい。

培養は、例えば大腸菌では通常約15～約45℃で約3～約75時間行い、必要によ

り、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～約20%の胎児牛血清を含むMEM培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6～約8であるのが好ましい。培養は通常約30～約40℃で約15～約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。所定の遺伝子産物を発現している形質転換体はそのまま利用可能であるが、その細胞ホモジュネートとしても利用できるが、所定の遺伝子産物を単離して用いることもできる。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100（商品名）、ツウィーン-20（商品名）などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

さらに得られた本発明のポリペプチド（又はタンパク質）は、化学的な手法で

その含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、ブロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などに行うことができる。本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH) またはカルボキシレート (-COO⁻) であるが、C末端がアミド(-CONH₂) またはエステル(-COOR) であってもよい。ここでエステルにおけるR としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド（又はタンパク質）には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₆アルキル-カルボニル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

さらに、本発明に係わる遺伝子の塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、所定のポリペプチドのアミノ酸配列中に適宜、1個ない

し複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するポリペプチドを製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、例えば日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法 II」、p105 (広瀬進)、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III (組換え DNA 技術)」、p233 (広瀬進)、東京化学同人(1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986 などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法 (部位特異的変異導入法) (Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987; Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), カセット変異導入法 (cassette mutagenesis: Wells et al., Gene, 34: 315, 1985), 制限部位選択変異導入法 (restriction selection mutagenesis: Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986), アラニン・スキャンニング法 (Cunningham & Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), PCR 変異導入法, Kunkel法, dNTP[α S]法 (Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

また、遺伝子組換え法で製造する時に融合ポリペプチド (融合タンパク質) として発現させ、生体内あるいは生体外で、所望のポリペプチドと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合ポリペプチドはその融合部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合ポリペプチドとしては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal)、マルトース結合タンパク (MBP)

、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン (TRX) 又は Cre Recombinase のアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジーニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、ポリヒスチジン (poly-His) 又はポリヒスチジン-グリシン (poly-His-Gly) タグ、また該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる (Field et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8: pp. 2159-2165 (1988); Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: pp. 3610-3616 (1985); Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6): pp. 547-553 (1990); Hopp et al., *BioTechnology*, 6: pp. 1204-1210 (1988); Martin et al., *Science*, 255: pp. 192-194 (1992); Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: pp. 15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: pp. 6393-6397 (1990) など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

さらに融合ポリペプチドとしては、検出可能なタンパク質となるようなマーカを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエーション)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来の GFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座 3 - GFP とバイオイメージング、羊土社 (2000年))。また、上記融合タ

グを特異的に認識する抗体（モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む）を使用して検出を行うこともできる。こうした融合ポリペプチドの発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

得られたタンパク質（ペプチドあるいはポリペプチドを包含している）は、それを酵素免疫測定法など知られた手法で、適当な担体あるいは固相に結合せしめて固相化することができる。固相化タンパク質、固相化ペプチドは、便利に結合アッセイや物質のスクリーニングに使用できる。

ポリペプチドやタンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生物化学実験講座1、タンパク質 VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。該修飾・改変のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、リン酸化、硫酸化、メチル化などのアルキル化、アセチル化などのアシル化、エステル化、アミド化、開環、閉環、グリコシル化、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、脂質結合、D-体アミノ酸残基への置換などであってもよい。それらの方法は、当該分野で知られている（例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, pp. 79-86 W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA (1983) 等）。

本発明のヒト由来のペプチドあるいはポリペプチド（又はタンパク質）は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。本発明のヒト由来のペプチドは、ヒトガレクチン9（L、M及びS型を含む）タンパク質に特有なアミノ酸残基が1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特に1～10個など）欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60

個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など)のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。

天然のヒトガレクチン9タンパク質の特徴であるドメイン構造あるいは糖結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のペプチドあるいはポリペプチドは天然のヒトガレクチン9タンパク質と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のものと実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明のヒト由来のタンパク質(又はペプチドあるいはポリペプチド)は、例えば、WO 02/37114 A1の配列表のSEQ ID NO:1～3から成る群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明のヒト由来のタンパク質の一部のものは、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド(すなわち、該タンパク質の部分ペプチド)であって、本発明の、ガレクチン9タンパク質と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、該ヒトガレクチン9の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好ましくは70個以上、もっと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、該WO 02/37114 A1の配列表のSEQ ID NO:1～3のいずれかーで示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

本明細書において、「実質的に同等」とはタンパク質の活性、例えば、所定の細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性、抗炎症活性、抗アレルギー活性、免疫抑

制活性、糖鎖結合活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理学的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性などの活性が、同等（例えば、約 0.001～約 1000 倍、好ましくは約 0.01～約 100 倍、より好ましくは約 0.1～約 20 倍、さらに好ましくは約 0.5～約 2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。次に、アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないし、ある場合には好ましい変化を与える。こうした場合、その置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性（中性）としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシク

ロヘキシルカルボジイミドなどカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

本発明のペプチド（又はポリペプチド）は、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することができ、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。

本発明のペプチド（又はポリペプチド）の塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

ガレクチン9発現遺伝子(cDNAなどのDNA及びmRNAなどのRNAを含む)を、上記した「遺伝子組換え技術」に従い、当該分野で特定の遺伝子の発現を検知測定するために知られた手法、例えばin situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、ドットブロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193(2000)及びそこで引用されている文献)、DNA アレイ解析法 (Mark Shena編、“Microarray Biochip Technology”, Eaton Publishing(2000年3月))などによって検知・測定して、本明細書開示のガレクチン9の示す生物活性に関連した現象などを検知することができる。こうした技術を利用したガレクチン9発現遺伝子測定系、それに利用する試薬、方法、プロセスなどは、すべて本発明の技術及びそれに利用するシステムに含まれる。該in situ ハイブリダイゼーションには、例えばノン RI in situ ハイブリダイゼーションが含まれてよく、そこには、例えば直接法及び間

接法が含まれてよい。該直接法は、例えば核酸プローブに検出可能な分子（レーポーター）が直接結合しているものを使用し、該間接法は、例えばレーポーター分子に対する抗体などを使用してシグナルを増幅せしめているものである。核酸プローブ中のオリゴヌクレオタイドには、官能基（例えば、第一級脂肪族アミノ基、SH基など）が導入されており、こうした官能基にハプテン、蛍光色素、酵素などが結合せしめられていてもよい。核酸プローブの標識としては、代表的にはジゴキシゲニン(DIG)、ビオチン、フルオレッセインなどが挙げられるが、上記したように抗体のところで説明した標識から適宜選択して使用することができるし、また多重ラベリングも利用でき、さらに標識抗体も利用できる。核酸プローブの標識法としては、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えばランダムプライム法、ニック・トランスレーション法、PCRによるDNAの増幅、ラベリング/テイリング法、in vitro transcription法などが挙げられる。処理された試料の観察には、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えば暗視野顕微鏡、位相差顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡、蛍光顕微鏡、デジタルイメージング顕微鏡、電子顕微鏡なども使用できるし、さらにフローサイトメトリーなどによることもできる。

本明細書中、悪性細胞とは、転移をする腫瘍細胞を包含してよい。転移をする腫瘍は悪性腫瘍で、一般的にその悪性腫瘍は上皮性と非上皮性のものがあるとされ、ある場合には、ガン、肉腫、白血病などに区分して考えられることもあるが、単に「ガン」と呼んだ場合、一般人では悪性腫瘍を指すことが多い。本明細書で「ガン」とは、広い意味で解釈してよく、単に上皮性の悪性腫瘍と解釈すべきではない。本明細書において「ガン」とは、上皮性悪性腫瘍及び非上皮性悪性腫瘍（腫瘍形成性のものも非形成性のものも含む）を包含してよく、皮膚ガン（メラノーマを含めてよい）、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン（肝細胞癌、肝内胆管ガンを含む）、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維

肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍（メニンギオーマ、グリオーマ、アストロサイトーマなどを含む）等が挙げられるが、これらに限定されることなく、ガレクチン9の有する活性を利用して本発明所定の目的対象になるものはすべて包含されて特には限定されないことは理解されるべきである。

本発明で解明されたガレクチン9の果たす機能を利用して、当該ガレクチン9の所定の生物学的活性などの機能（例えば、細胞傷害活性、アポトーシス誘導活性、グルコシルチコイドと類縁した活性、悪性細胞の転移を抑制する活性など）を促進する化合物（アゴニスト）や阻害する化合物（アンタゴニスト）又はそれらの塩をスクリーニングすることができる。このことは該スクリーニング試薬の提供も意味する。かくして、本発明で解明の当該ガレクチン9タンパク質などのポリペプチド、その一部のペプチド又はそれらの塩の示す活性を用いた、様々な物質に関し、本発明の当該ガレクチン9タンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などの示す生物学的活性などの所定の機能を促進する化合物（アゴニスト）や阻害する化合物（アンタゴニスト）又はそれらの塩のスクリーニング方法も提供される。

該スクリーニングでは、例えば(i) ガレクチン9タンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩（該タンパク質を発現する形質転換体を含んでもよい、以下同様）などに適当な試験試料を接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに問題の試験試料の存在しない場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性（例えば、各ガレクチン9タンパク質と生体成分との間の相互作用に関連した活性など）を測定して、比較する。

該スクリーニング系には、測定に便利となるよう適当な検知用基質を存在せしめてもよい。該基質としては、測定に有効に利用できるものであれば何れのものであってよい。例えば、公知の基質として知られているものの中から選んで用いることができるが、好ましくは合成された化合物などを使用できる。基質は、そのまま使用できるが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗ガレクチン抗体、酵素阻害剤、サイトカイン、各種インヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常の結合活性あるいは酵素活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常Tris-HCl緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4～約10（好ましくは、pH約6～約8）において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該ガレクチン9タンパク質あるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press 社 (USA) 発行〕など参照〕。また、アポトーシス誘導活性測定法などは、田沼靖一監修、「細胞工学別冊：実験プロトコルシリーズ、アポトーシス実験プロトコル」株式会社秀潤社、1995年1月20日（第1版第2刷）などを参考にできるし、市販の測定キットなどを使用できる。

本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される

塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

本明細書中、抗ガレクチン9抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。

本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望のガレクチン9ポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F(ab')₂、Fab' 及びFab といったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えら

れるもの、公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA 組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含している。特に好ましい本発明の抗体は、天然型のM 型ガレクチン9 (galectin-9 medium isoform or medium type galectin-9) ポリペプチド又は天然型のL 型ガレクチン9 (galectin-9 long isoform or long type galectin-9) ポリペプチドを特異的に識別できるものであり、例えば、L 型ガレクチン9 ポリペプチドやM 型ガレクチン9 ポリペプチドとS 型ガレクチン9 (galectin-9 short isoform or short type galectin-9) ポリペプチドとを区別して認識できるものである。

抗ガレクチン9 抗体をポリクローナル抗体として得るためには、免疫源であるガレクチン9 あるいはそのフラグメント、ガレクチン9 配列の一部のペプチドを哺乳動物、鳥類などに免疫し、当該哺乳動物、鳥類などから抗血清を採取する。そして、この抗血清に含まれるポリクローナル抗体を使用することができる。

このガレクチン9 を感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスターなど、さらに、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、サルなどの霊長類、ニワトリなどの鳥類等が使用される。さらには、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい場合もある。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物などの腹腔内または皮下に注射することにより行われる。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

ポリクローナル抗体を含む抗血清は、免疫された動物を所定の期間飼育した後、当該動物から採血した血液から調製することができる。得られた抗血清は、ガレクチン9 を特異的に認識するものであることを確認した後、本発明所定の活性成分として供される。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるガレクチン9は、公知のガレクチン9遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得ることができる（なお、ガレクチン9のアミノ酸配列は、WO 02/37114 A1に開示されている）。すなわち、ガレクチン9あるいはその一部のドメイン、ガレクチン9の一部のタンパク質あるいはポリペプチドフラグメント、ガレクチン9のアミノ酸配列に相当する一部のアミノ酸配列を持つペプチドをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のガレクチン9タンパク質あるいはその一部のドメインタンパク質、ガレクチン9の一部のタンパク質あるいはポリペプチドフラグメント、ガレクチン9のアミノ酸配列に相当する一部のアミノ酸配列を持つペプチドを公知の方法で精製する。

また、本発明において、抗ガレクチン9抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体として得られたものを使用することもできる。

抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基（エピトープ）に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の（ポリクローナル）抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他の免疫グロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来や

免疫グロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり（例えば、ヒト化抗体）、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など）。

モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法 (G. Kohler and C. Milstein, *Nature*, 256, pp. 495-497 (1975)); ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., *Immunology Today*, 4, pp. 72-79 (1983); Kozbor, *J. Immunol.*, 133, pp. 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987); トリオーマ法; EBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)) (ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法); 米国特許第4946778号 (単鎖抗体の産生のための技術) が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる: S. Biocca et al., *EMBO J.*, 9, pp. 101-108 (1990); R. E. Bird et al., *Science*, 242, pp. 423-426 (1988); M. A. Boss et al., *Nucl. Acids Res.*, 12, pp. 3791-3806 (1984); J. Bukovsky et al., *Hybridoma*, 6, pp. 219-228 (1987); M. DAINO et al., *Anal. Biochem.*, 166, pp. 223-229 (1987); J. S. Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, pp. 5879-5883 (1988); P. T. Jones et al., *Nature*, 321, pp. 522-525 (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp. 6851-6855 (1984); V. T. Oi et al., *BioTechniques*, 4, pp. 214-221 (1986); L. Riechmann et al., *Nature*, 332, pp. 323-327 (1988); A. Tramontano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp. 6736-6740 (1986); C. Wood et al., *Nature*, 314, pp. 446-449 (1985); *Nature*, 314, pp. 452-454 (1985) あるいはそこで引用された文献 (

それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)。

本発明に係るモノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスである、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を特に包含する（米国特許第4816567号明細書；Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp. 6851-6855 (1984)）。

本発明に係るモノクローナル抗体は、哺乳動物由来のハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により産生されるものを挙げることができる。

抗ガレクチン9抗体を産生するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、以下のようにしてミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して作製できる。

すなわち、ガレクチン9あるいはそのフラグメントを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。ガレクチン9あるいはそのフラグメントの調製方法及び哺乳動物に対する免疫方法等に関しては、上述したポリクローナル抗体を含む抗血清を調製する手法に準じて行うことができる。この場合、特に、哺乳動物に対して免疫した後、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞としては、公知の種々の細胞株を使用することができる。免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合などは、基本的には公知の方法、たとえば、ケラー及びミルステイン方法(Kohler, G. and Milstein, C., *Method*

s Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

以下、モノクローナル抗体を例に挙げて、抗体の作製につき詳しく説明する。

本発明の抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよく、例えば次のような工程で作製できる。

(1) 免疫原性抗原の調製、(2) 免疫原性抗原による動物の免疫、(3) ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製、(4) 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合、(5) ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化、及び(6) モノクローナル抗体の製造

(1) 免疫原性抗原の調製は次のようにして実施できる。抗原としては、上記で記載してあるように、天然型のガレクチン9ポリペプチド又はそれから誘導された断片（一部のドメインポリペプチド、リンクポリペプチド、フラグメント、一部のペプチド、合成ポリペプチドを含んでよい）を単離したものをを用いることもできるが、決定されたガレクチン9のアミノ酸配列情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができる。代表的には(1) WO 02/37114 A1に開示の配列表の配列番号:1及び配列番号:2のアミノ酸配列あるいはその一部のドメインのアミノ酸配列;(2)配列番号:3の一部のドメインのアミノ酸配列;(3)配列表の配列番号:4, 5, 7, 8 及び9 のアミノ酸配列;(4)配列表の配列番号:1のうち配列番号:4に相当するアミノ酸配列に続いているC 端側ドメインを構成するアミノ酸配列あるいはその一部のフラグメント;(5)配列表の配列番号:1のうち配列番号:4に相当するアミノ酸配列に先行するN 端側ドメインを構成するアミノ酸配列あるいはその一部のフラグメントなどから成る群から選ばれた領域に存在するアミノ酸残基のうちの連続した少なくとも5個のアミノ酸を有するペプチドが挙げられる。

抗原は、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、免疫原性コンジュゲートなどにしてもよい。例えば、免疫原として用いる抗原は、ガレクチン9を断片化したもの、あるいはそのアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。また、その断片を適当な縮合剤を介して種々

の担体タンパク質類と結合させてハプテンタンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる（あるいは特定の配列のみを認識できる）モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができ。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCG などが挙げられる。

(2) 免疫原性抗原による動物の免疫は次のようにして実施できる。免疫は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。免疫化剤を（必要に応じアジュバントと共に）一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び／又はアジュバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質（例えば上記担体タンパク質類など）とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカ

などが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウス、ハムスター、その他の適当な動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1～400 μg /動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1～4週間おきに、好ましくは1～2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2～10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。本発明の抗体は、こうして得られ免疫された動物から得られたものであってよく、例えば、抗血清、ポリクローナル抗体等を包含する。

(3) ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製は次のようにして実施できる。細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えば P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14 (SP-2, Nature, 276: 269～270, 1978)、マウスミエローマ MOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979) などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM 培地 (DMEM培地)、RPMI-1640 培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン（例えば5～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2～5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのち RPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

(4) 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は次のようにして実施できる。上記(2)の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2～5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所

のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。より具体的には、細胞融合は、例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS)等の血清補液を併用することもできる。かくして、こうして得られた脾細胞懸濁液と上記(3)の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640 培地などの細胞培地中に置き、細胞融合促進剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合促進剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダウィウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを 0.5~2 ml加えることができ、分子量が 1,000~8,000 のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が 1,000~4,000 のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどの補助剤を少量加え、融合効率を高めることもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合、すなわち融合に使用する脾細胞 (リンパ球) : ミエローマ細胞株の割合は、任意に設定することができ、例えば 1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは 4:1~10:1とすることができる。

細胞融合は、免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG 溶液 (例えば平均分子量1000-6000 程度) を通常30-60 % (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640 培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

(5) ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化は次のようにして実施できる。選択用培地としては、通常の実験培養液、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS 含有MEM 培地、RPMI-1640 培地などの培地、所謂 HAT培地が挙げられる。上記HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1～3日ごとに HAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8～16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1～4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)、発光免疫分析(LIA)、ウェスタンブロッティングなどの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、所定の断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の実験培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

(6) モノクローナル抗体の製造は次のようにして実施できる。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の

方法は、抗体の大量生産に適している。

かくして、得られたハイブリドーマ株は、FCS 含有MEM 培地、RPMI-1640 培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

また、トランスジェニックマウス又はその他の生物、例えば、その他の哺乳動物は、本発明の免疫原ポリペプチド産物に対するヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。当該モノクローナル抗体をコードする核酸は、例え

ばマウス抗体の重鎖や軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用するなどの慣用の手法で単離し配列決定することができる。一旦単離されたDNA は、発現ベクターに入れ、CHO, COSなどの宿主細胞に入れることができる。該DNA は、例えばホモジニアスなマウスの配列に代えて、ヒトの重鎖や軽鎖の定常領域ドメインをコードする配列に置換するなどして修飾することが可能である (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6581, 1984)。かくして所望の結合特異性を有するキメラ抗体やハイブリッド抗体も調製することが可能である。また、抗体は、下記するような縮合剤を用いることを含めた化学的なタンパク合成技術を適用して、キメラ抗体やハイブリッド抗体を調製するなどの修飾をすることも可能である。

ヒト化抗体は、当該分野で知られた技術により行うことが可能である (例えば、Jones et al., Nature, 321: pp.522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: pp.323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: pp.1534-1536 (1988))。ヒトモノクローナル抗体も、当該分野で知られた技術により行うことが可能で、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒトミエローマ細胞やヒト・マウスヘテロミエローマ細胞は当該分野で知られている (Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。バイスペシフィックな抗体を製造する方法も当該分野で知られている (Millstein et al., Nature, 305: pp.537-539 (1983); WO93/08829; Traunecker et al., EMBO J., 10: pp.3655-3659 (1991); Suresh et al., "Methods in Enzymology", Vol. 121, pp.210 (1986))。

さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

代表的な抗ガレクチン9抗体としては、L、M及びS型ガレクチン9の全てに結合する抗体、L及びM型ガレクチン9の双方に結合するがS型ガレクチン9とは反応しない抗体、L型ガレクチン9に結合するがM及びS型ガレクチン9とは反

応しない抗体、L、M及びS 型ガレクチン9のそれぞれに特異的な抗体、ガレクチン9のC-末端側CRD あるいはそのフラグメントペプチドに特異的な抗体、ガレクチン9のN-末端側CRD あるいはそのフラグメントペプチドに特異的な抗体、各リンクペプチドあるいはそのフラグメントペプチドに特異的な抗体などが挙げられる。

抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13 巻, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981);及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab' を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいは β -D- ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

本発明での検知・測定は、免疫染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫電子顕微鏡、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、放射免疫測定法(RIA), FIA, LIA, EIA, ELISA などをを用いることができ、B-F 分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくはRIA, EIA, FIA, LIAであり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、一方を本発明のL 型ガレクチン9 ポリペプチドに対する抗体あるいはL 型ガレクチン9の関連ペプチド断片に対する抗体とし、他方をガレクチン9のC 末端側残基に対する抗体とし、そして一方を検出可能に標識化する (もちろん、その他の組み合わせも可能であり、目的に応じて適宜デザインできる)。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応さ

せるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちガレクチン9ポリペプチド抗原の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことが出来る。

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えばアミノアルキルシリルガラスなどの活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリカーボネート、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレンーメタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレインーエチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、シリコンガムなど、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

さらに、ろ紙、ビーズ、チューブ、キュベット、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、マイクロプレート、ガラスセル、合成

樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる抗原に対し特異的に反応する抗ガレクチン9抗体（抗血清や精製抗体を含む）や抗ガレクチン9モノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、非金属元素粒子、例えばセレンコロイドなど、放射性物質などを挙げるができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げるができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$, $[^{125}\text{I}]$, $[^{131}\text{I}]$, $[^3\text{H}]$, $[^{14}\text{C}]$, $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリフォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニ

トロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。このように、ビオチン-アビジン系を使用したり、抗ガレクチン抗体に対する抗体などの二次的な抗体を使用するなど、当該分野で公知の感度増強法を適宜採用することができる。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、0-フェニレンジアミン (OPD)、テトラメチルベンジジン (TMB)、5-アミノサリチル酸、3,3-ジアミノベンジジントラヒドロクロライド (DAB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC)、チラミン、ルミノール、ルシゲニンルシフェリン及びその誘導体、Pholad luciferinなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、ルミジェンPPD、(4-メチル)ウンベリフェリルリン酸、p-ニトロフェノールリン酸、フェノールリン酸、プロモクロロインドリルリン酸(BCIP)、AMPAK™(DAKO)、AmpliQ™(DAKO)などとアルカリフォスファターゼ、4-メチルウンベリフェリルβ-D-ガラクトシドといったウンベリフェリルガラクトシド、0-ニトロフェノールβ-D-ガラクトシドといったニトロフェニルガラクトシドなどとβ-D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼ、ABTSなどとグルコースオキシダーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、例えばローダミンB イソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネートアイソマーR (TRITC) などのローダミン誘導体、7-アミノ-4- クマリン-3- 酢酸、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクォリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。発色、蛍光などを含めた生成する信号などを検知するには、視覚によることもできるが、公知の装置を使用することもでき、例えば蛍光光度計、プレートリーダーなども使用できる。また、放射性同位体（アイソトープ）などの出す信号を検知するには、公知の装置を使用することもでき、例えばガンマーカウンター、シンチレーションなども使用することができる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル) ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ) コハク酸イミド(BMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメ

ルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル) プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識した抗血清、精製抗体あるいはモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、標識した抗血清、精製抗体あるいはモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

本発明の測定法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4～約9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤、ベロナール緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0℃～約60℃の間の温度で行うことが好ましい。

酵素などで標識された抗血清、精製抗体、あるいはモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の

平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、下記するような界面活性剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA) がより好ましい。当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清や血清タンパク質、アルブミン、ヘモグロビン、オボアルブミン(OVA)、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。さらに、試料や固相などの洗浄には、上記した緩衝液系や食塩液から適宜適当な液を選択してそれを使用でき、さらにそこにTween 20 (商品名)、Tween 80 (商品名)、NP-40(商品名)、Triton X100(商品名)、Brij(商品名)などの非イオン性界面活性剤、CHAPSなどの両イオン性界面活性剤の他、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤などから成る群から選ばれたものを添加して使用できる。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば胸腺、睾丸、腸、腎臓、脳、乳房組織、卵巣、子宮、前立腺、結腸・直腸、胃、肺、気管支、膵臓癌、肝臓などの全ての臓器及び組織、さらにそれら臓器・組織の悪性腫瘍、白血病細胞、血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、胆汁液、唾

液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

ガレクチン9の測定系としては、例えば組織に対しては免疫染色(METHODS, 24, 289-296(2001); J Immunol Methods, 47(2), 129-144(1981); *ibid.*, 150(1-2), 5-21, 23-32 & 151-158(1992); Cancer J, 7(1), 24-31(2001) 等)、免疫電子顕微鏡(Mol Biotechnol, 7(2), 145-151(1997); J Electron Microsc Tech., 19(1), 57-63 & 64-79(1991); *ibid.*, 19(3), 305-315(1991) 等)といった蛋白測定系、in situ hybridization といった発現遺伝子測定系が、組織抽出物に対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティング(J Electron Microsc (Tokyo), 45(2), 119-127(1996); Methods Biochem Anal., 33, 1-58(1988); Methods Enzymol., 271, 177-203(1996); *ibid.*, 305, 333-345(2000); J Immunol Methods, 152(2), 227-236(1992); *ibid.*, 170(2), 177-184(1994); *ibid.*, 195(1-2), 149-152(1996); 口野嘉幸他編、「遺伝子・タンパク質、実験操作 ブロッティング法」、株式会社ソフトサイエンス社、昭和62年11月10日発行など)といった蛋白測定系、ノーザンブロッティング、ドットブロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)、Real-Time PCR (Clinical Chemistry, 46: 11, 1738-1743 (2000))といった発現遺伝子測定系、そして血中、体液などに対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングといった蛋白測定系を有利に利用できる。また抗ガレクチン9抗体の測定系としては、例えば血中、体液などに対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングといった蛋白測定系を有利に利用できる。

EIA の測定系において、例えば競合法では、抗ガレクチン9抗体を固相化抗体として使用し、標識抗原及び非標識抗原（抗原としては、ガレクチン9あるいは

そのフラグメントペプチドなどが挙げられる)を使用するし、また非競合法で、例えばサンドイッチ法では、固相化抗ガレクチン9抗体や標識抗ガレクチン9抗体を利用できる他、抗ガレクチン9抗体を直接標識したり、固相化せずに、抗ガレクチン9抗体に対する抗体を標識したり、固相化して行うこともできる。感度増幅法としては、例えば、非酵素標識一次抗体との組み合わせでは、高分子ポリマーと酵素と一次抗体を利用するもの(Envision試薬を応用したもの; Enhanced polymer one-step staining (EPOS))が挙げられ、非酵素標識二次抗体との組合せでは、例えば PAP (peroxidase-antiperoxidase)法などの酵素と抗酵素抗体複合体の組合せ、SABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-アビジン複合体の組合せ、ABC (streptavidin-biotin complex) 法、LSAB (labeled streptavidin-biotin)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-ストレプトアビジン複合体の組合せ、CSA (catalyzed signal amplification)法などのSABCとビオチン標識タイラミドと酵素標識ストレプトアビジンの組合せ、高分子ポリマーで二次抗体と酵素を標識してあるものなどが挙げられる。

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編, 「ラジオイムノアッセイ」, 講談社, 昭和49年発行; 入江 寛編, 「続ラジオイムノアッセイ」, 講談社, 昭和54年発行; 石川栄治ら編, 「酵素免疫測定法」, 医学書院, 昭和53年発行; 石川栄治ら編, 「酵素免疫測定法」(第2版), 医学書院, 昭和57年発行; 石川栄治ら編, 「酵素免疫測定法」(第3版), 医学書院, 昭和62年発行; H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press,

New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part B: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）]。

本発明の活性成分〔例えば、(a) 当該ガレクチン9 ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、(b) 当該ガレクチン9 あるいはその関連ポリペプチドをコードするDNA などの核酸等、(c) 本発明の所定の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) 当該ガレクチン9 タンパク質の問題の活性を制御する化合物（当該ガレクチン9 タンパク質の細胞傷害活性、アポトーシス誘導活性、正常細胞には悪影響を与えないで所定の効能を果たす活性などを促進したりあるいは抑制・阻害するなどの現象、あるいは組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を促進あるいは抑制及び、又は阻害する化合物）またはその塩、当該タンパク質産生を制御する化合物またはその塩、(e) 本発明を使用して見出された活性物質など〕を医薬として用いる場合、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態（

吸入法、あるいは直腸投与も包含される)によってもよい。

また、本発明の活性成分は、各種医薬、例えば抗腫瘍剤（抗がん剤）、腫瘍移行阻害剤、血栓形成阻害剤、関節破壊治療剤、鎮痛剤、消炎剤及び／又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的（例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髄腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など）に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤（例えば、直腸坐剤）、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もし

くは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒ

クルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1～10重量%程度含有するように調製されることができる。

局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエデト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。

坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセリド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1～95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。

経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液

状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

また、活性成分がタンパク質やポリペプチドである場合、ポリエチレングリコール (PEG) は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、それを結合させることは特に有用である。また、PEG を結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてもよい。PEG のようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の α -アミノ基、リジン側鎖の ϵ -アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の α -カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。

タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態の PEG が知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用な PEG 試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基が N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は 1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネートであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含有する PEG 試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸酸化によって生成したアルデヒドとの反応に有用である。

さらに、本発明の DNA などの核酸を上記したような治療及び/又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用する適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明の DNA などの核酸は通常の方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記した

ような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、本明細書で説明している、(a) ガレクチン9及びその類縁体、(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、(c) ガレクチン9産生及び遊離の誘導因子、(d) 抗ガレクチン9受容体抗体、(e) ガレクチン9結合性糖鎖に対する抗体などが挙げられ、それらはヒトガレクチン9が正常細胞には傷害活性を示さず、腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示すという性状、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しないという性状、悪性細胞の転移性を抑制するという性状、活性化された免疫細胞、特には活性化したCD4陽性T細胞のアポトーシスを誘導する活性（これに対しレスティングT細胞、特にCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）のアポトーシス誘導はそれを誘導しないという性状）などを利用する上で有用であり、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤、副腎皮質ステロイドホルモンと同様な活性を利用する薬剤として有望である。

[ガレクチン9結合タンパク質の探索]

ガレクチン9により上記明細書中で開示した新規な機能を発揮するのに関与しているガレクチン9結合分子、特にアポトーシス関連ガレクチン9結合タンパク質を探索・同定することを行うことができる。探索対象としては、特に限定されず種々の生物由来材料を使用できるが、代表的にはヒトT細胞由来株MOLT-4のようなガレクチン9添加により細胞死が誘導される細胞株を出発材料に選定してそれを行うことができ、ある場合には好ましい。相互作用分子探索法としては、当該分野で知られた様々な方法を単独あるいは任意に組合せて行うことができる。例えば、候補タンパク質からガレクチン9と相互作用するタンパク質を同定するには、例えば以下の方法から選択してそれを適用できる。相互作用しているタンパク質を知ることのより、標的タンパク質の新規の機能並びに調節機構、例えばガレクチン9を介したものの、を知ることが可能である。

利用できる方法としては、①免疫沈降法、②ウェストウェスタン法 (West Western法、またはファールウェスタン法: Far Western 法、リガンド・ブロッキング法を含む)、③分子間架橋法、④発現クローニング法、⑤ ツー・ハイブリッド・システム(Two-Hybrid system)、⑥ファージディスプレイ法、⑦表面プラズモン共鳴法、⑧蛍光偏光法などが挙げられるが、これらに限定されず、当該分野で知られた方法並びにその改変法を適用できる。

免疫沈降法とは、試料である種々様々なタンパク質溶液に、目的のタンパク質に特異的な抗体を加えて、目的のタンパク質と相互作用しているタンパク質を免疫複合体のまま免疫沈降物として単離し、SDS-PAGEや、さらにウェスタンブロッキングなどで同定するといった手法で、目的のタンパク質と相互作用しあうタンパク質の存在を検討するのに有効である。ここでは、目的のタンパク質に対する特異的な抗体あるいは既知タンパク質に対する特異的な抗体、プロテインA 又はプロテインG セファロースなどの抗体をトラップする樹脂などが使用できるほか、好ましくはRIなどで標識したタンパク質溶液を準備できることが好ましい。市販のキットを利用することも可能であり、例えば Affi-Prep 10, Affi-Gel Hz (BIO-RAD 社), NHS Sepharose HP (Pharmacia社) などが挙げられる。

測定対象タンパク質としては、融合タンパク質として作製・精製したものを利

用でき、この場合、Tag に対する抗体を有効に利用できて便利である、組換えタンパク質としては、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞などの宿主発現系を利用できるほか、網状赤血球の無細胞翻訳系を利用することも可能である。また、タンパク質溶液に目的の融合タンパク質を過剰に加えるなどし、融合タンパク質を簡便に精製するときに co-purificationすることも利用できる。それらの方法は、例えば、Rudner, D.Z. et al., Mol. Cell Biol., 116, 1765-1773, 1998 (His-tag 利用), Cleveland, d.w. et al., J. Mol. Biol., 116, 207-225, 1977 (tau (microtubule-associated protein)利用)などを参照することができる。

ウェストウェスタン法またはファーウェスタン法とは、ウェスタン法の変法で、抗体の代わりに標識した目的タンパク質などや既知のタンパク質などのプローブ・タンパク質を用いて、膜にトランスファーしたタンパク質との結合をみることにより、検知・測定を行うものである。目的タンパク質をプローブとして、結合するタンパク質の分布、局在、分子量などを知ることが可能な手法である。この方法は、発現ライブラリーのスクリーニングに応用してcDNAクローニングに利用することが可能である（野村照明、他、「免疫'92」（蛋白質プローブを用いたcDNAクローニング）、中山書店、pp169-175（1992））。プローブとしてのタンパク質がポロテインキナーゼでリン酸化標識できるものは有効にこれを利用できる。リガンド・ブロッティング法とは、リガンドと結合するタンパク質の解析手法であって、ファーウェスタンブロットの一種を指した方法で、RIで標識したリガンドを用いてそのRIで検出、ビオチン-リガンドを用いてストレプトアビジン・コンジュゲート抗体でもって検出、未標識リガンドを用いて、特異的な抗体と標識二次抗体を用いて検出するなどの手法である。標識としては、非RI標識を利用することも可能である。本法は、例えば Soutar, A.K. & Wade, D.P., Protein function: a practical approach (Creighton, T.E. eds.), IRL press, pp55-76, 1989 などを参照することができる。

分子間架橋法は、化学架橋剤を用いてタンパク質-タンパク質間を架橋せしめ、SDS-PAGEで分離、ウェスタンブロット法や免疫沈降法などを併せて行い検出するもので、目的のタンパク質のオリゴマー構造の解析や相互作用しているタンパク質あるいは近傍に存在するタンパク質（あるいはドメイン）の検討並びにレセ

プターなどのサブユニット構造の解析に有効な手法である。化学架橋剤などの情報は、PIERCE社のウェブサイト(<http://www.piercenet.com/>)を参照することができる。本法は、例えば Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996 などを参照できる。

発現クローニング法は、cDNAプールの中の任意のものを細胞で発現させて、目的のタンパク質あるいはタグ(Tag) 付きのタンパク質をプローブとして用いて、相互作用が認められた細胞に関連して、用いたcDNA群から特定のcDNAをクローニングするものであり、受容体、リガンドなどのクローニングを介して解析するものである。発現クローニングには、大腸菌などの原核細胞を利用した発現系、哺乳動物細胞などの培養細胞を利用した発現系、アフリカツメガエル卵細胞を利用した発現系など、当該分野で知られた発現系を利用できる。本法は、例えば 佐々木博己編、「無敵のバイオテクニカルシリーズ特別編・バイオ実験の進めかた」、第6章、羊土社、1997などを参照できる。大腸菌などでの発現クローニングでは、 λ gt11, λ ZAPII などのcDNAライブラリーを大腸菌などにトランスフォーメーションしてスクリーニングすることができ、基本的にはファウエスタン法でそれを行うことがなされる。また培養細胞での発現クローニングでは、特定のcDNAをもった発現ベクターを培養細胞にトランスフェクションして、発現が認められる細胞の中から目的のタンパク質と結合するものを選別し、クローニングすることでスクリーニングできる。選別には、それには限定されないが、ELISA法やFACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)法などが好適に使用できる。また、特定のcDNAからin vitroでmRNAを合成してアフリカツメガエルの卵にマイクロインジェクションして発現したタンパク質が目的のタンパク質と相互作用することやその結果引き起こされる細胞の反応を利用して選別しクローニングすることも可能である。

ツー・ハイブリッド・システムは、目的のタンパク質あるいはそのタンパク質のドメイン構造部分が独立したタンパク質ドメインと相互作用すると、レポーター遺伝子が発現するように構築した転写活性因子の機能回復という現象を利用して相互作用するタンパク質を探索する手法で、クローニングシステムである。本

方法には、市販のプライマードライブラリーを利用することも可能であり、これに限定されるものではないが、例えばMATCHMAKER GAL4 cDNA LIBRARY, MATCHMAKER LexA cDNA LIBRARY (Clontech社) などが挙げられる。また自作のライブラリー作製用としては、これに限定されるものではないが、例えばHybriZAP Two-hybrid vector system (Stratagene 社) などが挙げられる。本法は、例えば山本雅編、バイオマニュアルシリーズ1. 遺伝子工学の基礎技術、羊土社、1993, Downward, J., FEBL Lett., 338, 113-117, 1994などを参照することができる。

ファージディスプレイ法とは、5～7残基のランダムなアミノ酸配列をファージの表面にもつタイブラリーを用いて、目的のタンパク質と結合したファージを集め、ファージを増殖させる、との操作を繰り返すことにより、特異性の高いアミノ酸配列を検索する手法である。また、得られた結果からタンパク質データベースを検索し、既知のタンパク質の中から対応するものを選び出すことも可能である。本法は、例えば Smith, G.P. & Scott, J.K., Methods in Enzymology, Vol. 217, pp228-257, 1993などを参照できる。

表面プラズモン共鳴法は、典型的には、BIAcore™システムを利用して、センサーチップ上での生体分子間の相互作用をリアルタイムにモニターする目的で開発された手法である。該BIAcore™では、生体分子の固定化されていない側のセンサーチップ（金薄膜）に光を全反射するように当てると、反射光の一部に、反射光強度が低下した部分が観察される（SPR シグナル発生）。この光の暗い部分の現れる角度（＝屈折率の変化）は、センサーチップ上での質量に依存することを利用するものである。当該センサーチップとしては、センサーチップCM5:カルボキシメチルデキストラン表面をもつ、センサーチップSA: ストレプトアビジンをおらかじめ固定化してあるもの、センサーチップNTA: NTAを固定化したもので、ニッケルでキレートし、poly-His融合タンパク質を固定化することができるものなどが挙げられる。本法は、例えば橋本せつ子、ぶんせき 5、表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子相互作用の解析、pp362-368, 1997、夏目徹、バイオマニュアル UP シリーズ、タンパク質の分子間相互作用実験法、pp211-230, 羊土社、1996などが挙げられる。

蛍光偏光法は、平面偏光で励起された蛍光ラベルをもった分子が励起状態中に

回転などの運動を行った場合放射された蛍光は励起光とは異なった平面になるという現象を利用するもので、分子の純度等はその大きさに影響されるため、複合体形成などで高分子になると偏光を保ち、低分子で運動性が高い場合には偏光は解消される。そこでこの偏光度を測定してその相互作用を知ることができるのである。蛍光標識には、様々なものが利用できるが、例えばFS, FITC, FXS などを使用することができる。測定は、例えばFBEACON™などを使用して行うことができる。

さらに、アポトーシス関連ガレクチン9結合タンパク質を探索・同定することをアフィニティーカラムを利用して好適に行うことができる。アフィニティーカラムのリガンドとしては、合成ペプチド、融合タンパク質、抗体などを使用することができる。代表的な単離例として、MOLT-4の細胞破碎液を出発原料としてのガレクチン9結合タンパク質の取得について説明すると、MOLT-4の細胞破碎液をガレクチン9 CT (C末端領域) カラムに通し、ガレクチン9結合分子を回収する。次に回収した細胞由来タンパク質をゲル上で電気泳動して、分子量の応じて分離し、分離し得られたゲル片についてタンパク質の内部のアミノ酸配列を解析し、ガレクチン9結合タンパク質を同定できる。候補ガレクチン9結合タンパク質は、上記した候補タンパク質からガレクチン9と相互作用するタンパク質を同定する手法により、確定できる。

かくして、ガレクチン9結合タンパク質として、ヒト由来のタンパク質であって、以下のもの、すなわち、4F2 heavy chain antigen (177216); ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (21361181); sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2 truncated isoform (15004317); stromal cell derived factor receptor 1 isoform a (9257240); stromal cell derived factor receptor 1 isoform b; heat shock 90kDa protein 1, beta (20149594); heat shock 90kDa protein 1, alpha; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (16507237); heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 (24234686); heat shock 70kDa protein 9B precursor (24234688); fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3 (27469830); NADH dehydrogenase (ubi

quinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4826856); S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (21361647); programmed cell death 8 isoform 1 (4757732); 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (129379); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle (4757810); ribophorin II precursor (88567); farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (4758350); Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (21903482); dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (21104416); calcium-binding transporter (6841066); NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S protein 2 precursor (3540239); actin, beta (14250401); translation elongation factor EF-Tu-like protein P43 precursor, mitochondrial (7443384); metaxin 1 (4505281); sideroflexin 1 (23618867); TCR beta chain (2982508); Hnrnp A1 (2194069); phosphate carrier precursor isoform 1b (4505775); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 (4885079); voltage-dependent anion channel 1 (4507879); hyaluronan-binding protein precursor (8699626); androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 (20070798); solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11 (21361114); 3-hydroxybutyrate dehydrogenase precursor (17738292); B-cell receptor associated protein (1673514); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (4502303); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d (5453559); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 (21361565); small GTP-binding protein (13569962); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4505371); vesicle trafficking protein sec22b (4759086); mitochondrial import receptor Tom22 (9910382); signal sequence receptor, delta (5454090); ATP synthase, alpha chain (114517 or P25705); ATP synthase, beta chain (114549 or P06576); Sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain (1703470 or P54709); ADP, ATP ca

carrier protein (113463, P12236, 113459, P05141, 113455 or P12235); ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 1 (731047 or P31930); Cytochrome c oxidase polypeptide II (117020 or P00403)が挙げられる。特に、ガレクチン9結合タンパク質として、ヒト由来のタンパク質であって、以下のもの、すなわち、4F2 heavy chain antigen (177216); ATPase, Na⁺ /K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (21361181); sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2 truncated isoform (15004317); stromal cell derived factor receptor 1 isoform a (9257240); stromal cell derived factor receptor 1 isoform b; heat shock 90kDa protein 1, beta (20149594); heat shock 90kDa protein 1, alpha; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (16507237); heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 (24234686); heat shock 70kDa protein 9B precursor (24234688); S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (21361647); programmed cell death 8 isoform 1 (4757732); 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (129379); ribophorin II precursor (88567); farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (4758350); dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (21104416); calcium-binding transporter (6841066); TCR beta chain (2982508); hyaluronan-binding protein precursor (8699626); androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 (20070798); B-cell receptor associated protein (1673514) 及びSodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain (1703470 or P54709) について、上記①免疫沈降法、②ウェストウェスタン法 (West Western法, またはファーウェスタン法: Far Western 法、リガンド・プロット法を含む)、③分子間架橋法、④発現クローニング法、⑤ ツー・ハイブリッド・システム(Two-Hybrid system)、⑥ファージディスプレイ法、⑦表面プラズモン共鳴法、⑧蛍光偏光法などを適用して、ガレクチン9と相互作用するタンパク質としての性状を詳しく調べることができる。

なお、上記で括弧 ○ 内の数字は、NCBIのホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)にてその数字を入力することにより、タンパク質情報並びにそれをコードするDNA などの核酸配列の情報を得ることができる。したがって、当該アミ

ノ酸配列情報及びDNAなどの核酸配列情報を利用すること、すなわち、本明細書でガレクチン9を例に挙げて説明した技術・手法を、同様に当該タンパク質及びコード遺伝子配列に対して適用できる。こうした適用可能技術・手法のうちには、モノクローナル抗体の作製及び利用を含めた抗体作製及び利用技術が当然含まれる。したがって、本明細書において、ガレクチン9に代えて上記ガレクチン9結合分子に置き換えてその記載を読み理解すべきで、そうした読替えて得られた内容はすべて本明細書の中に含まれる。

例えば、被験者の生体試料におけるガレクチン9結合分子のポリヌクレオチドの存在量を試験し、ポリヌクレオチドの存在量が健常者のそれらと比較して多い被験者をガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待できる者と判定することを特徴とする診断方法が提供できる。同様に、被験者の生体試料におけるガレクチン9結合分子タンパク質の存在量を試験し、ガレクチン9結合分子タンパク質存在量が健常者と比較して多い被験者をガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待できる者と判定することを特徴とする診断方法が提供できる。また、ガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドや、該ガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドを備えたDNAマイクロアレイ、ガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドをPCR増幅するためのプライマーセット、ガレクチン9結合分子を認識する抗体、当該抗体とは異なるエピトープと結合する抗体なども提供される。さらに、少なくとも以下の要素：(a) ガレクチン9結合分子を認識する抗体；および(b) 前記(a)の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体で且つ標識化した抗体からなることを特徴とするガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の測定方法並びに測定キット、少なくとも以下の要素：(a) ガレクチン9結合分子を認識する抗体を固定化したプレートまたはメンブレン；および(b) 前記(a)の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体で且つ標識化した抗体からなることを特徴とするガレクチン9感受性又はガレクチン9によ

り誘起される生理活性の期待度の測定又は検知方法あるいは測定又は検知キット、すくなくとも以下の工程：(a) 被験者の生体試料を上記抗体を固定化した担体と接触する工程；(b) 該生体試料と接触せしめた固相担体を洗滌する工程；(c) 該生体試料と接触せしめた固相担体を標識化した上記抗体と接触する工程；(d) 固相化された標識あるいは遊離である標識を測定する工程；(e) 工程(d) で測定された標識量をガレクチン9 結合分子量の指標とし、対照生体試料の結果と比較する工程；および(f) 対照生体試料と比較して有意に高いガレクチン9 結合分子タンパク質存在量を、ガレクチン9 感受性又はガレクチン9 により誘起される生理活性の期待度の程度を示す指標として使用する工程を含むことを特徴とする上記記載のガレクチン9 関連生理反応の程度を測定する方法、すくなくとも以下の工程：(a) 被験者の生体試料よりRNA を調製する工程；(b) 工程(a)で調製されたRNA を電気泳動分離する工程；(c) 工程(b) で分離されたRNA をガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下で標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程；(d) 工程(e) でハイブリダイズしている標識量をガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチド発現量の指標とし、対照生体試料の結果と比較する工程；および(e) 対照生体試料と比較して有意に高いガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチド発現量を、ガレクチン9 感受性又はガレクチン9 により誘起される生理活性の期待度の程度を示す指標として使用する工程を含むことを特徴とする上記記載のガレクチン9 関連生理反応の程度を測定する方法、すくなくとも以下の工程：(a) 被験者の生体試料よりRNA を調製する工程；(b) 工程(a)で調製されたRNA を鋳型にdTプライマーを使用して第1 鎖cDNAを調製する工程；(c) 工程(b)で調製されたcDNAを鋳型にガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチドをPCR増幅するためのプライマーセットを使用してPCR増幅する工程；(d) 工程(c) で得られたPCR産物を電気泳動分離する工程；(e) 工程(d) で分離されたPCR産物をガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程；(f) 工程(e) でハイブリダイズしている標識量をガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチド発現量の指標とし、対照生体試料の結果と比較する工程；および(g) 正常な生体試料と比較して有意に高いガレクチン9 結合分子ポリヌクレオチド発

現量を、ガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の程度を示す指標として使用する工程を含むことを特徴とする上記記載のガレクチン9関連生理反応の程度を測定する方法、すくなくとも以下の工程：(a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；(b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；(c) 切片化した組織をガレクチン9結合分子を認識する抗体による免疫組織染色に付す工程；(d) 被験者の生体試料における免疫組織染色の程度を、対照試料のそれらと比較する工程；および(e) 対照生体試料と比較して有意に高いガレクチン9結合分子タンパク質存在量を、ガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の程度を示す指標として使用する工程を含むことを特徴とする上記記載のガレクチン9関連生理反応の程度を測定する方法、以下の工程：(a) 被験者の生体試料をガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドをPCR増幅するためのプライマーセットを使用してPCR増幅する工程；(b) 被験者の生体試料から分離した核酸分画を上記DNAマイクロアレイを使用した分析にかける工程；(c) 被験者の生体試料から分離した核酸分画をガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイズする工程から成る群から選ばれたも工程のすくなくとも一つを含み、且つ被験者の生体試料におけるガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドの存在量を試験し、ポリヌクレオチドの存在量が健常者のそれらと比較することを含むことを特徴とする、上記記載のガレクチン9関連生理反応の程度を測定する方法、定量的にガレクチン9結合分子タンパク質存在量又はガレクチン9結合分子ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とする上記のいずれかに記載の、上記記載のガレクチン9関連生理反応の程度を測定する方法、上記のいずれかに記載の、ガレクチン9関連生理反応の程度を測定する方法において使用する、上記のいずれかに記載の抗体を含有することを特徴とする試薬、ガレクチン9結合分子を認識する抗体を使用し、検体試料中のガレクチン9結合分子タンパク質の量又はガレクチン9結合分子ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とするガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の程度あるいはガレクチン9関連生理反応の程度を測定又は診断する方法、ガレクチン9結合分子を認

識する抗体を含有し、検体試料中のガレクチン9結合分子タンパク質量又はガレクチン9結合分子ポリヌクレオチド発現量を測定し、ガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の程度あるいはガレクチン9関連生理反応の程度を測定又は診断する試薬も提供できる。診断、測定などにおける具体的な判定基準としては、被験者のポリヌクレオチドの存在量が、例えば対照のそれと比較して、10%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは100%以上である場合である。

マイクロアレイの作製方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する方法とが知られている。この発明で使用するマイクロアレイは、このいずれの方法でも作製することができる。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（マスキング技術：例えば、Fodor, S.P.A. Science 251:767, 1991）等によって行うことができる。一方、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する場合には、官能基を導入したオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面にオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。

オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一般的には、表面処理した固相担体にスペーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこに合成オリゴヌクレオチドを共有結合させる方法も知られている（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化オリゴヌクレオチド

を固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている (Sosnowski, R. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997)。

このマイクロアレイを使用して診断又は測定する場合には、例えば被験者の細胞から単離したmRNAを鋳型として、cDNAを合成し、PCR増幅する。その際に、標識dNTPを取り込ませて標識cDNAとする。この標識cDNAをマイクロアレイに接触させ、マイクロアレイのキャプチャープローブ（オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）にハイブリダイズしたcDNAを検出する。ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注して標識cDNA水性液を、マイクロアレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、1～100nl程度とすることができる。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃の温度範囲で、6～20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識cDNAを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

ガレクチン9結合分子ポリヌクレオチドの測定は、プライマーセットを用いて、当該ポリヌクレオチド（具体的にはmRNA）の発現量を測定することでもできる。この手法では、RT-PCT法を好適に使用できる。また、競合PCT法を使用して定量的な測定を行うことも好ましい。このプライマーセットは公知の塩基配列に基づき設計し、合成・精製の各工程を経て調製することができる。同様に、競合用プライマーもガレクチン9結合分子遺伝子の塩基配列を基にそれを設計し合成することができる。なお、プライマー設計の留意点として、例えば以下を挙げることができる。プライマーのサイズ（塩基数）は、鋳型DNAとの間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40塩基、望ましくは15-30塩基である。ただし、LA (long accurate) PCRを行う場合には、少なくとも30塩基が効果的である。センス鎖（5'末端側）とアンチセンス鎖（3'末端側）からなる1組あるいは1対（2本）のプライマーが互いにアニールしないよう、両プライマー間

の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。さらに、鋳型DNAとの安定な結合を確保するためGC含量を約50%にし、プライマー内においてGC-richあるいはAT-richが偏在しないようにする。アニーリング温度は T_m (melting temperature) に依存するので、特異性の高いPCR産物を得るため、 T_m 値が55-65°Cで互いに近似したプライマーを選定する。また、PCRにおけるプライマー使用の最終濃度が約0.1~約1 μ Mになるよう調整する等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えばOligoTM [National Bioscience Inc. (米国) 製]、GENETYX [ソフトウェア開発(株) (日本) 製] 等を用いることもできる。

ガレクチン9結合分子発現遺伝子(cDNAなどのDNA及びmRNAなどのRNAを含む)を、上記「遺伝子組換え技術」に従い、当該分野で特定の遺伝子の発現を検知測定するために知られた手法、例えばin situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットング、ドットブロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193(2000)及びそこで引用されている文献)、DNA アレイ解析法 (Mark Shena編、“Microarray Biochip Technology”, Eaton Publishing(2000年3月))などによって検知・測定して、本明細書開示のガレクチン9 関連生理現象とガレクチン9結合分子の示す生物活性に関連した現象などを検知することができる。こうした技術を利用したガレクチン9結合分子発現遺伝子測定系、アポトーシス検出系、抗腫瘍性検出系、それに利用する試薬、方法、プロセス、解析プログラムなどは、すべて本発明の技術及びそれに利用するシステムに含まれる。該in situ ハイブリダイゼーションには、例えばノン RI in situ ハイブリダイゼーションが含まれてよく、そこには、例えば直接法及び間接法が含まれてよい。該直接法は、例えば核酸プローブに検出可能な分子(レーポーター)が直接結合しているものを使用し、該間接法は、例えばレーポーター分子に対する抗体などを使用してシグナルを増幅せしめているものである。核酸プローブ中のオリゴヌクレオタイドには、官能基(例えば、第一級脂肪族アミノ基、SH基など)が導入されており、こうした官能基にハプテン、蛍光色素、酵素などが結合せしめられていてもよい。核酸プローブ

の標識としては、代表的にはジゴキシゲニン(DIG)、ビオチン、フルオレッセインなどが挙げられるが、下記抗体のところで説明する標識から適宜選択して使用することができるし、また多重ラベリングも利用でき、さらに標識抗体も利用できる。

核酸プローブの標識法としては、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えばランダムプライム法、ニック・トランスレーション法、PCRによるDNAの増幅、ラベリング／テイリング法、in vitro transcription法などが挙げられる。処理された試料の観察には、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えば暗視野顕微鏡、位相差顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡、蛍光顕微鏡、デジタルイメージング顕微鏡、電子顕微鏡なども使用できるし、さらにフローサイトメトリーなどによることもできる。本発明では、ガレクチン9結合分子タンパク質またはその関連ポリペプチドあるいはオリゴペプチド及びガレクチン9結合分子発現遺伝子を、様々なマーカーあるいは抗腫瘍マーカー又は発癌あるいは癌の悪化のマーカーとして使用することができ、それにより、様々な形態の症状の検出剤あるいはリスクの検出及び／又は測定剤、ガレクチン9関連生理現象の検出法あるいはリスクの検出及び／又は測定法、さらにはそういった検出あるいはリスク検出及び／又は測定試薬セットあるいはシステムを作成でき、本明細書で開示し説明している様々な疾患・症状の診断、予防、治療において役立つばかりでなく、それらは優れている。さらにそれらは、疾患を治療した後、即ち、予後についても、それを対象とした再発検出剤あるいは予後検出及び／又は測定剤、それらの検出法あるいは危険性検出及び／又は測定法、さらにはそれらのための検出及び／又は測定試薬セットあるいはシステムとすることが可能であり、予後のものとしても優れた機能、作用効果を期待できる。

被験者の生体試料におけるガレクチン9結合分子タンパク質の存在量を試験し、ガレクチン9結合分子タンパク質存在量が対照と比較して多い場合をガレクチン9感受性又はガレクチン9により誘起される生理活性の期待度の程度あるいはガレクチン9関連生理反応の程度が高いと判定する方法が提供される。具体的な判定基準としては、被験者のガレクチン9結合分子タンパク質の存在量が対照の

それと比較して、10%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは100%以上である場合である。ガレクチン9結合分子タンパク質の存在量は、ガレクチン9結合分子を認識する抗体あるいはガレクチン9結合分子と特異的に結合する抗体（抗ガレクチン9結合分子抗体）を用いて測定することができる。当該抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であるべく、ガレクチン9結合分子タンパク質のエピトープに結合することができる全体分子、およびFab、F(ab')₂、Fv断片等が全て含まれる。

測定系としては、例えば組織に対しては免疫染色、免疫電子顕微鏡などの蛋白測定系、in situ hybridization などの発現遺伝子測定系が、組織抽出物に対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングなどの蛋白測定系、ノーザンブロッティング、サザンブロッティング、ドットブロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)、Real-Time PCR、競合PCR などの発現遺伝子測定系、そして血中、体液などに対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングといった蛋白測定系を有利に利用できる。

EIA の測定系において、例えば競合法では、抗ガレクチン9結合分子抗体を固相化抗体として使用し、標識抗原及び非標識抗原（抗原としては、ガレクチン9結合分子あるいはそのフラグメントペプチドなどが挙げられる）を使用するし、また非競合法で、例えばサンドイッチ法では、固相化抗ガレクチン9結合分子抗体や標識抗ガレクチン9結合分子抗体を利用できる他、抗ガレクチン9結合分子抗体を直接標識したり、固相化せずに、抗ガレクチン9結合分子抗体に対する抗体を標識したり、固相化して行うこともできる。感度増幅法としては、例えば、非酵素標識一次抗体との組み合わせでは、高分子ポリマーと酵素と一次抗体を利用するもの（Envision試薬を応用したもの；Enhanced polymer one-step staining (EPOS))が挙げられ、非酵素標識二次抗体との組合せでは、例えば PAP (peroxidase-antiperoxidase)法などの酵素と抗酵素抗体複合体の組合せ、SABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-アビジン複合体の組合せ、ABC (streptavidin-biotin complex) 法、LSAB (labeled streptavidin-biotin)法などのビオチン標識二次抗体とビオチ

ン標識酵素ーstreptavidin複合体の組合せ、CSA (catalyzed signal amplification)法などのSABCとビオチン標識タイラミドと酵素標識streptavidinの組合せ、高分子ポリマーで二次抗体と酵素を標識してあるものなどが挙げられる。

実施例

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

実施例 1

(1) 材料及び方法

(a) 細胞培養物

MOLT-4 (T 細胞)、Jurkat (T 細胞)、BALL-1 (B 細胞)、THP-1 (acute monocytic leukemia 由来細胞) 及び HL60 (acute promyelotic leukemia 由来細胞) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) より入手した。セルラインのすべては、10% FCS を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma、セントルイス、米国) 中で 5% CO₂ の条件下 37°C で維持した。Gal-9 の活性を阻害するために、培養用培地には 30mM のラクトースを添加した。コントロールとして同じ濃度のスクロースを用いた。

(b) リコンビナント Gal-9 (rGal-9) の発現と精製

公知の方法 (例えば、Matsushita, N. et al., J. Biol. Chem., 275: 8355 (2000); 及び Nishi, N. et al., Endocrinology, 141: 3194 (2000)) のようにして rGal-9 を (His)₆-ガレクチン 9 (ショートタイプ) [(His)₆-Gal-9(S)] として発現させて精製した。すなわち、Gal-9 発現プラスミドを保有する大腸菌 BL-21 株を 100 µg/ml のアンピシリンを含有する LB 培地 (Gibco BRL、ロックビル、メリーランド州、米国) 中で生育せしめた。

融合タンパク質の発現を誘導するためIPTG (イソプロピル β -D-(-)-チオガラクトピラノシド、和光純薬、大阪、日本) を添加した。大腸菌抽出物をラクトースアガロース (生化学工業、東京、日本) のアフィニティークロマトグラフィーに付した。吸着されたタンパクを200mM のラクトースで溶出した。溶出分画を集め、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルー R250で染色して解析した。rGal-9を含有する画分をプールし、0.1mM ジチオスレイトール (dithiothreitol (DTT)) を含んでいるPBS に対して透析を行った。

また、野生型ガレクチン9 (galectin-9S, galectin-9M 及びgalectin-9L) の発現ベクターの構築、組換えタンパクの発現並びに精製については、M. Sato et al., Glycobiology, Vol.12, No. 3, pp.191-197 (2002) のようにして行った。

(c) アポトーシス アッセイ

(1) PIによる細胞周期(apoptosis) 解析(PI法)

アポトーシス誘導処理された細胞を、4℃ 5分間1000 rpmで遠心処理した後、細胞ペレットを PBS (300 μ l) に再浮遊させ、ボルテックスしながら、細胞浮遊液に100%冷エタノール (700 μ l) を徐々に添加して、終濃度70% エタノールとなるようにする。4℃で30分間インキュベート処理して細胞を固定し、次にPBS (1 ml) を加えて4℃ 5分間1000 rpmで遠心処理した後、細胞ペレットを PBS (440 μ l) に再浮遊させる。細胞を2.5 mg/ml のリボヌクレアーゼA (10 μ l; 終濃度50 μ g/ml, Sigma、セントルイス、ミズリー州、米国) と共に37℃で30分間インキュベーション処理し、次いで2.5 mg/ml のヨウ化プロピジウム (4 μ l; PI, 終濃度20 μ g/ml, Sigma) と共に4℃10分間暗闇中インキュベーション処理をした。ナイロンメッシュを通して集塊となった細胞を除いたのち、細胞をPBS でメスアップして、染色細胞をフローサイトメトリー (Sandstrom, K. et al., J Immunol Methods, 240: 55 (2000) 及びZhang L. et al., Cancer Lett, 142: 129 (1999)) によって解析した。

(2) TUNEL (TdT-mediated 標識dUTP nick end labeling) 法

DNAの断片化によって生じた末端に、DNA 末端にヌクレオチドを付加する酵素 (TdT; ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ) でもって、

ラベルしたヌクレオチド(dUTP-biotinあるいはFITC-dUTP など)を組み込んで、アポトーシスの顕著な特徴である細胞核DNAの断片化を検出する。

実験には、MEBSTAIN Apoptosis Kit Direct (MBL、名古屋、日本)を使用した。キット業者による指示に従って、実験を次のように行った。すなわち、アポトーシス誘導をした細胞(約 2×10^5 個/サンプル)を0.2% FSA含有PBS で洗い、次に4%パラホルムアルデヒド(0.1 M NaH_2PO_4 , pH7.4 中)を加えて4℃30分間固定化した後、0.2% FSA含有PBS で洗った。細胞ペレットに70% 冷エタノールを添加して-20℃30分間インキュベーション処理し、透過性を亢進せしめた。0.2% FSA含有PBS で洗った後、細胞ペレットにTdT 反応液(TdT、FITC-dUTP 及びTdT バッファの混合物)を加え、攪拌後37℃で1時間インキュベーション処理し、0.2% FSA含有PBS で洗った後0.2% FSA含有PBS に再浮遊させてから、染色細胞をフローサイトメトリーによって解析した。

(3) 培養した細胞株をrGal-9と共に適切な時間、例えば24時間といった時間インキュベーションした。次に上記(1)のPI法によりアポトーシス解析を行った。

また、アネキシン(Annexin) V-PIによるアポトーシス解析のためには、MEBCYT 0 (登録商標) アポトーシスキット (MBL、名古屋、日本)を使用した。キット業者による指示に従って、実験を次のように行った。すなわち、アポトーシス誘導をした細胞(2×10^5 個/サンプル)をPBS で洗い、次に結合用バッファに再懸濁した。キットのAnnexin V-FITC及び5 μl のPI (終濃度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を細胞懸濁液中に加えた後、細胞を暗所で15分間室温でインキュベーション処理した。フローサイトメーター(EPICS XL-MCL, CouHer, Miami, FL, 米国)を使用して、解析を行った。

細胞はGal-9 と共に、10 μM のZ-VAD-FMK (パン-カスパーゼ阻害剤)、Z-YVAD-FMK (カスパーゼ-1阻害剤)、Z-IETD-FMK (カスパーゼ-8阻害剤)、Z-LEHD-FMK (カスパーゼ-9阻害剤)、Z-ABVD-FMK (カスパーゼ-10阻害剤)、あるいはZ-LLY-FMK (カルパイン阻害剤) (以上、BioVision, CA, 米国)の存在下にインキュベーション処理して、カスパーゼまたはカルパインがGal-9により誘導

されるアポトーシスに関与するか否かを調べた。Z-FA-FMK(BioVision, CA, 米国) をコントロールとして使用した (Vu C. C. et al., J. Biol. Chem., 276: 37602 (2001) 及び Sweeney E. A. et al., FEBS Lett., 425: 61 (1998))。各阻害剤はGal-9 刺激の1時間前に添加した。

次なる試薬は、それぞれ以下に示された供給業者より購入した：

DEX (BioVision, CA, 米国)、抗Fas 抗体 (クローンCH-11, MBL)、TNF α (Genzyme, Cambridge, MA, 米国)、C₂セラミド(SIGMA) 及びエトポシド(BioVision)。

(d) T細胞解析

24ウェルプレートを各ウェルあたり 3 μ g/mlの抗CD3抗体 (Immunotech, Marseille, 仏国) のTBS 液(pH8.0) で4℃一晩インキュベーション処理した後、抗CD3抗体液を除き、ウェルをPBS で洗滌して、抗CD3抗体でコートしたウェルプレートを得た。

ヘパリン加血液から単核白血球細胞分画をHISTOPAQUE (登録商標、SIGMA) を使用して単離した。次に、CD4陽性単離キット(CD4-positive isolation kit; DYNAL, Oslo, ノルウェー国) 及びDynabeads (登録商標) M-450 CD8 (DYNAL, Oslo, ノルウェー国) を使用して、キット製造業者が記載しているようにして、CD4陽性T細胞及びCD8 陽性T細胞をそれぞれ単離した。

T細胞を活性化するためには、CD4陽性T細胞又はCD8 陽性T細胞を10%FCS含有RPMI-1640 に 1×10^6 個/ml とした細胞を、20～24時間37℃で抗CD3抗体でコートされたプレート上で5%CO₂インキュベーター中インキュベーション処理し、次にrGal-9 [(His)₆-Gal-9(S)] と一緒に37℃で5%CO₂インキュベーター中インキュベーション処理をした。次に、上記(c) と同様にしてアポトーシス・アッセイを行った。すなわち、細胞を37℃で50 μ g/mlのPI(Sigma) と共に暗所で10分間インキュベーション処理をした。染色細胞をフローサイトメトリー (Sandstrom, K. et al., J Immunol Methods, 240: 55 (2000) 及びZhang L. et al., Cancer Lett, 142: 129 (1999))によって解析した。

非活性化 (レスティング) T 細胞についても、rGal-9 [(His)₆-Gal-9(S)] と

一緒に37°Cで5%CO₂インキュベーター中インキュベーション処理をした後、上記と同様にしてアポトーシス・アッセイを行った。

比較として、ガレクチン1及びガレクチン3で処理した場合も試験した。

(e) Ca²⁺ 流入

培養培地(10% FCS, 10mM HEPES含有RPMI-1640, pH 7.2)中の細胞(おおよそ 10⁶~10⁷ 個/ml)を細胞内カルシウムインディケーターであるfluo-3 AM (最終濃度 10 μM, Dojindo, Kumamoto, 日本)と一緒に37°Cで30分間インキュベーション処理をした(Sharp, B. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8294 (1996))。次に細胞を洗ってから、培養培地に再度懸濁した(最終濃度、おおよそ 2 × 10⁵ 個/ml・サンプル)。フローサイトメーターでもって細胞内カルシウムを測定した。休止細胞の蛍光強度を測定した後1分してその細胞に刺激を加えた。

次に、別の刺激を加えるまで連続して記録をとることを再度始めた。ラクトール阻害アッセイについては、30mMのラクトースの存在下に細胞を刺激した。コントロールとしては30mMのスクロースを使用した(Sano, H. et al., J. Immunol., 165: 2156 (2000))。ポジティブコントロールとしてはA23187 (カルシウムイオノフォア、終濃度 5ng/ml, Wako, Osaka, 日本)を使用した。

[結果]

(1) Gal-9によるアポトーシスの誘導

各種細胞株に対するGal-9 のアポトーシス誘導活性を調べた。その結果、rGal-9と共にインキュベーション処理したMOLT-4細胞はPIでもって染色された。この染色された細胞をアポトーシスを起こした細胞として数えた。図1 Aに示すように、rGal-9 (1 μM)は、MOLT-4細胞のアポトーシスを誘導した(コントロールのPBS では、14.8% の細胞がPI染色された細胞でアポトーシスを起こした細胞であるのに対して、Gal-9 で処理された群では、34.5% の細胞がPI染色された細胞でアポトーシスを起こしていた)。そうしたアポトーシスの誘導をGal-9 は、時間依存的に且つ用量依存的に行っていた。PI法で検知されるアポトーシスは、rGal

-9の濃度を大きくすると増加し、インキュベーション時間を長くするとこれまた増大した（例えば、0.3 μ MのrGal-9で、インキュベーション時間24時間とか、1 μ MのrGal-9で、インキュベーション時間6時間）。

アポトーシスの間にフォスファチジルセリンが生じ、それは染色法で検出できるので、Annexin V 染色法を使用してGal-9 のプロアポトーシス活性を調べた。Annexin V 法で検出されるアポトーシスを起こした細胞は、コントロールの13.2% から、1 μ M のGal-9 では69.1% へと増大していた（図1 B）。このことによりGal-9 はMOLT-4細胞に対してプロアポトーシス活性を持つことが確認された。

次に、Gal-9 のアポトーシス誘導活性に及ぼすラクトースの作用を調べたところ、図2に示すように、Gal-9 のプロアポトーシス活性は、30 mM のラクトースによりほとんど完全に阻害されたが、シュクロースでは阻害されなかった。このことからGal-9 誘起アポトーシスには、 β -ガラクトシド結合活性が必要であることが示唆された。

(2) Gal-9 による様々な細胞のアポトーシス発生

Gal-9 のプロアポトーシス活性が、他の細胞株に対しても見られるか否かを調べた。すなわち、1 μ M のrGal-9の存在下あるいは非存在下に細胞を24時間培養して、アポトーシスが生じているか否かを調べた。図3に示すように、アポトーシスは、Jurkat細胞やMOLT-4細胞などのT細胞だけでなく、B細胞（BALL-1）、単球性細胞（THP-1）及び骨髓性細胞（HL60）においてもGal-9 で誘導された。なお、図3中黒塗りの棒は、Gal-9 存在下処理群を示し、白い棒は、コントロールを示す。さらに、そのGal-9 のプロアポトーシス活性は、ラクトースで抑制されたが、シュクロースでは抑制されなかった。

次に、ヒトの末梢血T細胞に対するGal-9 誘起アポトーシスを調べた。T細胞をCD 4⁺ T細胞及びCD 8⁺ T細胞に分離し、抗CD 3抗体の存在下及び非存在下にインキュベーションした。次に非活性化（レスティング）T細胞と抗CD 3抗体で活性化されたT細胞を1 μ M のrGal-9の存在下にインキュベーション処理した。結果を表1に示す。

表1

| CD3 | Galectin-9 | CD4 | CD8 |
|-----|------------|------|------|
| (-) | (-) | 6.2 | 7.7 |
| (-) | (+) | 10.8 | 17.8 |
| (+) | (-) | 8 | 8.5 |
| (+) | (+) | 41.7 | 25.7 |
| | | | |
| CD3 | Galectin-1 | CD4 | CD8 |
| (-) | (-) | 6.2 | 7.7 |
| (-) | (+) | 8.1 | 9.6 |
| (+) | (-) | 8 | 8.5 |
| (+) | (+) | 13.9 | 19 |
| | | | |
| CD3 | Galectin-3 | CD4 | CD8 |
| (-) | (-) | 6.2 | 7.7 |
| (-) | (+) | 9.6 | 14.7 |
| (+) | (-) | 8 | 8.5 |
| (+) | (+) | 15.7 | 20.9 |

表1中、CD3(+)は抗CD3抗体でコートされたプレート上で処理され、活性化されていることを示し、CD3(-)は抗CD3抗体でコートされたプレートによる処理はされていないので、非活性化（レスティング）細胞であることを示す。各ガレクチンの下の(+)は、その存在下での処理、(-)は非存在下での処理を、そしてCD4はCD4陽性T細胞を、CD8はCD8陽性T細胞を示す。

図4から、Gal-9はレスティングCD4+ T細胞やレスティングCD8+ T細胞と比較して、CD3-活性化CD4+ T細胞やCD3-活性化CD8+ T細胞の両者をよりアポトーシスせしめることは明らかであった。なお、図4中黒塗りの棒は、Gal-9存在下処理群を示し、白い棒は、コントロールを示す。さらに、CD8+ T細胞と比較して、CD4+ T細胞のほうが、よりGal-9に感受性が認められた（図4）。

(3) カスパーゼ阻害

Gal-9 誘起アポトーシスにカスパーゼ活性化経路が関与しているか否かについて調べた。まず始めに、パンカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMK と共にMOLT-4細胞をインキュベーション処理し、次いでrGal-9と共にインキュベーションした。Gal-9 誘起アポトーシスはこのパンカスパーゼ阻害剤でほとんど完全に抑制された(図5及び6)。例えばデキサメサゾン (DEX)、抗Fas 抗体、TNF- α 、C2セラミドなどのその他の刺激により誘導されるアポトーシスも、該パンカスパーゼ阻害剤で抑制されることが観察されている。

各種のカスパーゼに対するカスパーゼ阻害剤、すなわち、カスパーゼ-1に対するZ-YVAD-FMK、カスパーゼ-8に対するZ-IETD-FMK、カスパーゼ-9に対するZ-LEHD-FMK、及びカスパーゼ-10 に対するZ-AEVD-FMKを使用して実験を行った。

その結果を図5に示す。唯一Z-YVAD-FMK (カスパーゼ-1阻害剤) がGal-9 誘起アポトーシスを抑制したが、その他の阻害剤はいずれもGal-9 誘起アポトーシスを抑制しなかった。同時に、該カスパーゼ-1阻害剤は、DEX 誘起アポトーシスを抑制し、カスパーゼ-8阻害剤及びカスパーゼ-10 阻害剤は、抗Fas 抗体誘起アポトーシス及びTNF- α 誘起アポトーシスを抑制し、カスパーゼ-9阻害剤は、C2セラミド誘起アポトーシスを抑制することを見出している。さらに、図6に示されているように、パンカスパーゼ阻害剤とカスパーゼ-1阻害剤との双方がGal-9 誘起アポトーシスを用量依存的に抑制した。こうした抑制現象は他の細胞株を使用した実験でも得られる。こうした結果から、Gal-9 はカスパーゼ-1を介してアポトーシスを誘導しているのであって、他のカスパーゼを介する経路でそれを行っているのではないと考えられる。

(4) カルシウム-カルパイン経路

カスパーゼ-1の活性化にはカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが必要とされるので、MOLT-4細胞のGal-9 誘起アポトーシスにカルパイン・カスパーゼ-1活性化系が関与しているのか否かを調べた。図7に示すように、カルパイン阻害剤である Z-LLY-FMKは、Gal-9 誘起アポトーシスを用量依存的に阻害した。

さらに、MOLT-4細胞におけるカルシウムの流入をGal-9 が生ぜしめるか否かを

調べるため、Fluo-3アッセイを行った。図8に示すように、Gal-9 を添加すると10～20秒でMOLT-4細胞においてカルシウムの流入が上昇したが、ラクトースによりGal-9 誘起のカルシウムの流入は抑制された。一方、シュクロースではGal-9 誘起のカルシウムの流入は抑制されなかった。コントロールとして用いたA23187（終濃度 5 ng/ml）では、明らかにMOLT-4細胞においてカルシウムの流入を誘導した（図8）。

また、その他の細胞においてもGal-9 誘起アポトーシスにおいてカルパイン並びにカルシウムの流入が関与していることを確かめることができる。

(5) DEX、抗Fas 抗体及びエトポシドにより誘起されるアポトーシスに及ぼすGal-9 の効果

他の刺激（例えば、DEX、抗Fas 抗体、エトポシドなど）により誘導されるアポトーシスに及ぼすGal-9 の作用効果について調べた。

rGal-9、DEX、抗Fas 抗体、そしてエトポシドのすべてが、MOLT-4細胞のアポトーシスを明らかに誘導した（図9）。

MOLT-4細胞をrGal-9並びにDEX と共にインキュベーション処理した場合、アポトーシスを起こした細胞の割合（％）にはほとんど僅かな違いであるかあるいは差がないものであった。一方、rGal-9は、抗Fas 抗体誘起アポトーシス並びにエトポシド誘起アポトーシスに付加的な作用を示した（図9）。これらの結果は、Gal-9 によるアポトーシス化経路は、DEX 以外の他の刺激によるものとは異なっていることを示唆したものであった。

かくして、Gal-9 は、様々な細胞、特に試験された免疫細胞の全てにおいてアポトーシスを誘導することが見出された（図3及び4）。これは、Gal-9 が多くのタイプの細胞に対するプロアポトーシス活性を持つ因子として機能していることを示すものである。

例えば、グルコルチコイド(GC)、抗Fas抗体、酸化性のストレスなどのその他の刺激に関して、アポトーシス化経路をそれぞれ解析した。例えば、抗Fas抗体はFasリガンドに結合してカスパーゼ-8活性化を介してアポトーシスを誘導し

、エトポシドはDNAを障害し、ミトコンドリアのチトクローム c を遊離せしめ、カスパーゼ-9を活性化し、最終的にアポトーシスを誘導する (Sun X. M. et al., J. Biol. Chem., 274: 5053 (1999))。DEXはカルシウム依存性エンドヌクレアーゼ及びカスパーゼ-1を活性化し、細胞死をもたらす (Cheneval, D. et al., J. Biol. Chem., 273: 17846 (1998); McConkey, D. J., J. Biol. Chem., 271: 22398 (1996)及びCohen, J. J. et al., J Immunol., 132: 38 (1984))。GCは多くのタイプの細胞においてアポトーシスを誘導し、もちろん、T細胞においてもアポトーシスを誘導する (Dobashi H. et al., FASEB, 15: 1861 (2001) 及び Nittoh, T. et al., Eur. J. Pharmacol., 354: 73 (1998))。そのメカニズムは解析されており、GC並びにカスパーゼ-1が胸腺細胞においてカルシウム依存性アポトーシスを誘導することが示されている (McConkey, D. J., J. Biol. Chem., 271: 22398 (1996) 及び Cohen, J. J. et al., J Immunol., 132: 38 (1984))。

本発明において、Gal-9 がアポトーシスを誘導すること、それは Ca^{2+} 流入 (図 8)、カルパイン関与 (図 7)、そしてカスパーゼ-1の活性化 (図 5 及び 6) に引き続いて生ずることを見出したが、このことはGal-9 はカルシウム-カルパイン-カスパーゼ-1経路を使用して、GCのようにしてアポトーシスを誘導していることを示すものである。

カルシウムはカルシウム-カルパイン経路とミトコンドリア経路との両方を介してU937細胞のアポトーシスを誘導していることが見出されている (Li M. et al., J. Biol. Chem., 275: 39702 (2000))。また、Gal-9 はさらに抗Fas抗体やエトポシドにより誘導されるアポトーシスを増加せしめる。

GC誘導による細胞死の間にはGal-1 遺伝子が過剰発現されている (Goldstone S. D. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 746 (1991))。加えて、Gal-1 はJurkat細胞における Ca^{2+} 流入並びにアポトーシスを誘導している (Walzel, H. et al., Glycobiology, 10: 131 (2000))。これは、カルシウム-カルパイン-カスパーゼ-1経路は、少なくとも、部分的には、Gal-1仲介アポトーシスに関与するものであることを示唆するものである。事実、Gal-1誘導アポトーシスには細胞内カルシウムの上昇は必要でない (Pace, K. E. et al., J Immunol.,

165: 2331 (2000))。一方、Gal-7 は、JNK 活性化及びチトクローム c の遊離の上流の細胞内で機能するプロアポトーシス活性を持つガレクチンであるようである(Kuwabara, I. et al., J. Biol. Chem., 277: 3487 (2002)及びBernerd, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 11329 (1999))。これは、Gal-7 のプロアポトーシス活性経路は、Gal-1 やGal-9 のそれとは異なっていることを示唆するものである。

本発明者等はこれまでGal-9 は試験した細胞の細胞表面に結合することを見出している。GCは細胞質内のレセプターに結合すると、該レセプターは結合後核に移動していく(Galigniana, M. D. et al., J. Biol. Chem., 274: 16222 (1999)及びGuiochon-Mantel, A. et al., EMBO J., 10: 3851 (1991))。一方、Gal-9 は細胞表面の結合分子に結合し、その後、Ca²⁺流入、カルパイン・カスパーゼ-1 活性化を誘導し、細胞をアポトーシスに至らしめると思われる。Gal-9 のレセプター並びにその存在場所はDEXとは異なるけれども、Gal-9 はGCの場合と似たアポトーシス化経路を介してアポトーシスを誘導しているように思われる。事実、Gal-9 は、抗Fas抗体-仲介のアポトーシスやエトポシド-仲介のアポトーシスの両方に付加する作用を示すが、DEX-仲介のアポトーシスに何らの付加する作用も持たないかあるいはほんの僅かの付加する作用を持つのみである(図9)。また、本発明者等はGal-9 が抗Fas抗体によるアポトーシスを強めるが、Gal-9 はDEX-誘起好酸球アポトーシスを抑制することを見出している。

DEX はラットにおいてCD 4+ T細胞及びCD 8+ T細胞の双方でアポトーシスを誘導すること(Tsuchiyama, Y. et al., Kidney Int., 58: 1941 (2000))並びにヒトT細胞でアポトーシスを誘導すること(Dobashi H. et al., FASEB, 15: 1861 (2001))が見出されている。また、Gal-9 は腎炎のラットにおいて活性化された脾臓のCD 8+ T細胞において選択的なアポトーシスを誘導する(Tsuchiyama, Y. et al., Kidney Int., 58: 1941 (2000))。

本発明において、Gal-9 はヒト末梢血由来細胞中では活性化されたCD 8+ T細胞(サプレッサーT細胞や細胞傷害性T細胞)よりも活性化されたCD 4+ T細胞

(ヘルパーT細胞)においてよりアポトーシスを誘導すること(図4)が見出された。このことはGal-9が免疫抑制性因子(immunosuppressive factor)として働いている可能性を示すものである。それゆえに、Gal-9は好酸球活性化の活性と共に、CD 4+ T細胞などの様々な免疫細胞のアポトーシスを誘導することにより、免疫の制御調整に重要な働きをなしていると思われる。

実施例 2

(1) ガレクチン9による細胞傷害活性

Jurkat T細胞株、K-562白血病細胞、正常リンパ球に対し、PIを用いたフローサイトメトリー解析法で細胞傷害性を測定した。すなわち、標的細胞と1 mMのガレクチン9を16時間インキュベーション処理した後、最後の15分間PIを加えると傷害を受けた標的細胞ではPIが細胞内に進入する。このPIから発せられる蛍光をFACSで測定する。ネガティブコントロールとして何も加えない細胞を、100%死細胞としてはホルマリンで固定した細胞を用い、陽性コントロールとして H_2O_2 (過酸化水素水)を用いた。表2に示すように、ガレクチン9はJurkat細胞株、K-562細胞に対して明らかな細胞傷害活性を示すが、正常のリンパ球には傷害活性は示さなかった。

表2

| | 刺激 | 16時間 |
|--------|-------------------------------|------|
| Jurkat | (-) | 1.02 |
| | Galectin-9 | 46.2 |
| | H ₂ O ₂ | 97.7 |
| K-562 | (-) | 0.73 |
| | Galectin-9 | 23.4 |
| | H ₂ O ₂ | 99.2 |
| 正常リンパ球 | (-) | 1.12 |
| | Galectin-9 | 2.47 |
| | H ₂ O ₂ | 96.8 |

(2) ガレクチン9によるガン細胞アポトーシス

PI法でアポトーシスの測定を行った。ガレクチン9と共に培養された細胞を洗浄後、アルコールで固定すると、断片化されたDNAが細胞外に流出する。その後PIと共にインキュベーション処理をするとアポトーシス細胞は蛍光強度が低くなる。その細胞の割合でアポトーシスを検討した。図10に示すように、72時間ガレクチン9と共に培養された悪性メラノーマ細胞MM-RUでアポトーシスが強く誘導されていることから、ガレクチン9はガン細胞アポトーシスを誘導することが示された。この誘導は、陽性コントロールとして用いたH₂O₂（過酸化水素水）と同等であった。また、他のアポトーシス測定法であるTUNEL法でも同じ結果がえられた。次に、他の悪性腫瘍細胞にも、ガレクチン9によるアポトーシス誘導が見られるか否かの検討を行った結果を、表3に示す。

表3

| Cell Lines | Gal9 (-) | Gal9 (+) |
|------------|----------|----------|
| Jurkat | 13.8 | 66.6 |
| MOLT-4 | 14.8 | 34.5 |
| BALL-1 | 9.2 | 26.0 |
| THP-1 | 8.3 | 61.2 |
| HL-60 | 38.1 | 64.6 |
| MCF-7 | 7.5 | |
| KATO-III | 1.0 | 30.5 |
| Daudi | 59.7 | 58.5 |
| HMC-1 | 27.0 | 26.2 |

表3中、Jurkat及びMOLT-4は、T細胞由来悪性細胞、BALL-1はB細胞由来悪性細胞、THP-1はacute monocytic leukemia由来細胞、HL60はacute promyelotic leukemia由来細胞、MM-RUは悪性メラノーマ細胞、MCF-7は乳癌細胞、KATO-IIIは胃癌細胞である。ガレクチン9存在下でのインキュベーション処理は少なくとも48時間以上行った。表3から、ガレクチン9によるアポトーシス誘導は非上皮性悪性細胞、上皮性悪性細胞のいずれにも見られることが分かる。Daudi細胞(B細胞)やHMC-1(マスト細胞)では全くアポトーシスの誘導がみられない。これらのことから、細胞表面にはアポトーシスのシグナルと関係のある結合因子であって且つガレクチン9結合因子と関係のないものの存在があることを示している。このことを利用して、アポトーシス関連ガレクチン9結合分子の同定やそれを利用した腫瘍増殖抑制技術の開発が可能である。

ガレクチン9は、上皮性悪性腫瘍(ガン)と非上皮性悪性腫瘍(肉腫や白血病など)のすべてにおいて抗腫瘍活性を示す。一方、活性化されていない正常のT細胞にはアポトーシス誘導活性をほとんど示さない。例えば、1 μ M のガレクチン9を存在下でアポトーシス誘導活性を測定した結果は次の表4に示すようなものである(表4中、ガレクチン3も1 μ M)。

表 4

| | CD4 T細胞 | CD8 T細胞 |
|------------|---------|---------|
| | Resting | Resting |
| (-) | 0.8 | 0.8 |
| Anti-Fas | 15.9 | 8.3 |
| Galectin-9 | 1.8 | 1.4 |
| Galectin-3 | 10.3 | 15.9 |

こうしたことから、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9アゴニスト、ガレクチン9アンタゴニスト拮抗物質、抗ガレクチン9結合蛋白抗体、抗ガレクチン9結合糖鎖抗体、ガレクチン9産生・遊離誘導物質などを、正常細胞には作用しない、腫瘍細胞に傷害活性を示し、アポトーシスを誘導する抗腫瘍剤（抗ガン剤）として使用可能である。

実施例 3

(1) ガレクチン9によるガン転移抑制活性

ヒトメラノーマ細胞株のうち、MM-BP とMM-RU ではその細胞株を培養すると、前者は凝集し、胞巣形成性に増殖を示すが、後者はフリーの形で増殖する。ヒトメラノーマ細胞株のMM-BP とMM-RU からメッセンジャーRNA を採取し、RT-PCR法でガレクチンのDNA 量を解析した結果、MM-BP とMM-RU とではガレクチン1やガレクチン3の量は差異がないが、ガレクチン9では、胞巣形成性のMM-BP にのみ明らかに見られたが、フリーの形で増殖するMM-RU では非常に弱かった（図11）。

乳ガン細胞株MCF-7は、胞巣形成性の細胞であるが、限界希釈法にてサブクローンを作製して、明らかな胞巣形成性を示さないMCF-7 K-10株を樹立した（図12）。MCF-7はウェスタンブロット法でガレクチン9を有していたが、MCF-7 K-10株ではガレクチン9が検出できなかった（図13）。また免疫染色法でMCF-7のガレクチン9は主に細胞質に見られた。

RT-PCRは、T. Kageshita et al., Int. J. Cancer, 99: 809-816 (2002) に記載の方法に従って行われた。

MCF-7 の細胞培養は、グルタメート、10% 胎児ウシ血清(fetal bovine serum) 及びペニシリンとストレプトマイシン(ICN biomedical, Aurora, OH, 米国) を添加したDulbecco修飾Eagle's 培地中で行い、インキュベーターは5%CO₂/37°Cのものを使用した。

ウェスタンブロット解析は次のようにして行った。おおよそ10⁶ 個の細胞を取得し、150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5% Nonidet P-40 (Boehringer-Mannheim, GmbH, 独国), 1 mM PMSF (ICN biomedical), 50 TIU aprotinin (Wako, 大阪、日本) 及び 50 mg/ml Leupeptin (Calbiochem, San Diego, CA, 米国) を含有しているリシスバッファで処理して細胞膜を破壊した。得られた上清液を2x sample バッファ(125 mM Tris-HCl, pH6.8, 20% glycerol, 2% 2-mercapto ethanol, 4% SDS, 0.02% Bromophenol Blue)と共に5 分間煮沸処理し、5-15% グラジエントのゲルにかけ、ミニゲル装置(Bio-Rad, Richmond, CA, 米国) でのSDS/PAGEにより分離処理に付した。分離されたタンパクは、PVDF膜 (Millipore, Bedford, MA, 米国) に転写し、0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, 米国) 含有の5%スキムミルク液で1 時間ブロッキング処理した後、2 μ g/mlの抗ガレクチン-9抗体(α -galectin-9 CT) 液(5 ml)と一緒にインキュベーション処理した。次に西洋ワサビペルオキシダーゼでコンジュゲート化されたヤギの抗ウサギIgG 抗体 (Amarsham, Buckinghamshire, UK)で処理し、ECL システム(Amarsham)によりバンドを可視化した。

免疫染色は次のようにして行った。ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を抗ガレクチン-9ポリクローナル抗体(α -galectin-9 CT) で免疫組織化学染色するには、DAKO EnVision + TM, Peroxidase, Rabbit System を使用し、キット製造業者の指示書に従い操作した。4 μ m のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を脱パラフィン化及び再ハイドレーション化の前に16分間抗原再生用のクエン酸塩バッファ(10 mM) 中で煮沸処理した。0.3%パーオキサイドで処理して内因性のペルオキシダーゼ活性を消失せしめてから、当該切片を5%ウシ血清アルブミン(BSA) で処理して室温で2 時間非特異的な染色をブロックした。該組織切片を

第一抗体と共に室温で一晩インキュベーション処理し、次に室温で1 時間抗ウサギIgG 及び西洋ワサビペルオキシダーゼ（両者共にポリマーに結合せしめてある）を含有するEnVision + TM 液と共にインキュベーション処理した。3,3'-ジアミノベンジジン・テトラヒドロクロライドを発色剤として使用した。ネガティブコントロールとしては免疫前のウサギから得られた血清からの免疫グロブリン画分(DAKO)を使用した。すべての切片はGiemsa液でもってcounterstaining を行い、各切片につき二人の観察者が別々に染色された腫瘍細胞の比率を求め、50% よりも大きな値のものを陽性の染色とした。

(2) ガレクチン9 による細胞凝集誘導

大腸菌に遺伝子導入して作製された組換えガレクチン9 を外からMM-RUに添加し、ガレクチン9 の作用効果について検討を行った結果、ガレクチン9 では0.1 μ M の濃度からMM-RU の凝集を誘導した。また、その程度は濃度依存的であり、0.3~1.0 μ M で著明であった。さらに、凝集はガレクチン9 添加後2 時間でみられ、12時間後で強い凝集が見られた（図1 4）。対照として用いたガレクチン1 やガレクチン3 では少なくとも1 μ M の濃度では明らかな凝集は誘導しなかった。

乳ガン細胞株より樹立されたMCF-7 K-10株にガレクチン9 遺伝子を導入すると、その細胞は細胞質にガレクチン9 を保有するとともに、培養するときに、明らかな胞巣形成性を示しながら、増殖した（図1 5）。

ヒトガレクチン9 の三つのサブタイプ、すなわちガレクチン-9S、ガレクチン-9M 及び、ガレクチン-9L の発現ベクターの構築は、各ガレクチンのコード領域全部を持ち、それに開始コドンの上流に7 個のヌクレオチドを付加してあるcDNA をpBK-CMV (Stratagene)のEcoRI-XhoIサイトに挿入して行った。細胞へのガレクチン9 遺伝子の導入は、Fugene 6トランスフェクション試薬(Roche Molecular Medicals)を使用し、試薬製造業者のプロトコールに従ってそれを行った。MCF-7 K-10株細胞は、pBK-CMV プラスミド単独でトランスフェクションされたもの、及びヒトガレクチン9 cDNA を保有するベクターでトランスフェクションされたものにつき試験された。細胞は、2 週間 800 μ g/mlのG418で選択処理された。

かくして、ガレクチン9は転移性の悪性細胞に対して凝集誘導的に作用し、ガンなどの悪性腫瘍の転移抑制活性を有することは明らかであり、ガン転移抑制剤として有用である。こうした事実から、ガレクチン9タンパクあるいはその誘導体、またはガレクチン9遺伝子導入やガレクチン9の産生・遊離を誘導することにより、ガン転移抑制作用を得ること、さらにはガン転移抑制剤を提供できる。

ヒトガレクチン9は、腫瘍細胞に対して細胞障害活性を示す一方で、正常細胞に対しては細胞障害活性を示さないことは注目される。さらに、ヒトガレクチン9は、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対してはアポトーシスを誘導しない。そして、また、ヒトガレクチン9は、非活性化T細胞のアポトーシスを誘導しないのに対して、活性化したT細胞のアポトーシスを誘導する。これにより、ヒトガレクチン9は、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び／又は副腎皮質ステロイドホルモン代替用剤として有用であることは明らかである。本発明では、DEX、抗Fas抗体及びエトポシドにより誘起されるアポトーシスに及ぼすヒトガレクチン9の作用・効果が確認され、それにより、ヒトガレクチン9が上記用途に極めて有用であることが確かめられているのである。

実施例4

MOLT-4（ヒトT細胞）（おおよそ 7.25×10^9 個の細胞、湿重量 約18g）を凍結融解を繰り返して細胞破碎処理を行った。得られた細胞破碎処理物を洗滌処理（200 mM ラクトース(lac) 含有液）し、ホモジュネート処理して、細胞破碎液を均一化した。遠心処理し、沈殿物（ペレット）を回収した。界面活性剤を使用して沈殿物の可溶化を行った。代表的には界面活性剤として、Triton（商品名）を使用して沈殿物の可溶化を行った。遠心処理後上清を回収した。得られた上清を次にGST-カラム（非特異的吸着カラム）にかけた。カラムを通過する画分を集めた。次にGST-カラム通過液を GST-gal9CT カラムに添加し、ガレクチン9 特異的吸着をさせた。カラムを洗滌した後、200 mMラクトース(lac) 含有液をカラムに流し、ガレクチン9CT (galectin 9CT)と細胞含有タンパクとの結合をはずした。gal9CTカラムに吸着した細胞(MOLT-4)由来タンパクのSDS-PAGEの結果を図16に

示す。

図16に示した各画分1～12及びA, B, C, Dについて、それに含まれるタンパク質を解析した。解析は、株式会社アプロサイエンス (APRO Life Science Institute, 徳島県鳴門市瀬戸町) に委託して行った。バンドA, B, C, Dについては、タンパク質の内部配列解析を行い、バンド1～12については質量分析(LC-MS/MS)を行って候補を同定した。先ず、タンパク質の内部配列解析においては、上記SDS-PAGEで分離したバンドから得られた試料をプロテアーゼによる限定分解(例えば、ゲル内消化)にかけ、得られたプロテアーゼ限定分解試料が > 1 pmol の場合は、逆相HPLCによるペプチドの分離処理(ペプチドマップの作成)をした後、シーケンシング装置を使用してアミノ酸配列分析を行い、得られたプロテアーゼ限定分解試料が > 0.1 pmol の場合は、質量分析装置(LC-MS/MS)で解析し、データベースサーチを行った。Mascot search による該当するタンパクのスコア化を行い、スコアの高いもの(しきい値以上のもの)を候補としてピックアップした。Mascot search については、Matrix Science Ltd. より詳しい情報を入手できる(<http://www.matrixscience.com/>)。Mascotは、Mowse アルゴリズム(D. J. C. Pappin, et al., Curr. Biol., 3, 327-332 (1993))をベースに製品化されたものである。

アミノ酸配列分析装置としては、Procise 494HT (Applied Biosystems), Hewlett-Packard G1005A, 島津 PSQ-1 (グラジエントシステム), Procise 494cLC (Applied Biosystems)などを使用できる。データベースは、NCBI nr (Protein), db EST (DNA) などを使用できる。LC-MS/MS装置としては、Q-TOF2 & キャピラリーHPLCなどが挙げられる。場合によっては、MALDI-TOF MS分析を行うこともでき、MS-Fitサーチを利用することも可能である。MALDI-TOF MS分析は、Voyager-DE STRなどを利用できる。

<結果>

質量分析(LC-MS/MS)については、すべてのプリカーサーイオンについて得られたプロダクトイオンの数値をMascotによりすべての生物種(all entries)を対象にデータベース(NCBI nr)検索した。NCBI nrデータベースにて消化酵素やhuman ke

ratin 以外に有意のスコアでヒットしなかった場合はdbEST データベース (human, mouse, othersを対象) にて検索を行った。

有意のスコアでヒットしたタンパク質について、Mascot Search Results のヒット番号に基づき以下に示す。同一のヒット番号で複数のタンパク質がヒットしている場合、代表的なタンパク質（主にサンプルと同一の生物種を選択）を記載している。また、使用した消化酵素やhuman keratin（操作上のコンタミネーション由来）がヒットした場合はデータから除いた。

なお、NCBIのホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)にて“gi |”の後の数字を入力することにより、タンパク質情報並びにコード遺伝子情報を得ることができる。

バンド1

[NCBI nr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : 4F2 heavy chain antigen
source : human
Total score : 153
Peptides matched : 5
データベース上の同定番号 : gi | 177216
Sequence coverage : 12%
- (2) タンパク質名 : ATPase, Na⁺ /K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
source : human
Total score : 150
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 21361181
Sequence coverage : 5%
- (3) タンパク質名 : sodium-dependent neutral amino acid

1 0 4

transporter type 2 truncated isoform
source : human
Total score : 134
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 15004317
Sequence coverage : 8%

(5) タンパク質名 : stromal cell derived factor receptor 1
isoform a
source : human
Total score : 57
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 9257240
Sequence coverage : 3%

(6) タンパク質名 : heat shock 90kDa protein 1, beta
source : human
Total score : 46
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 20149594
Sequence coverage : 3%

バンド2

[NCBI nr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

(1) タンパク質名 : heat shock 70kDa protein 5
(glucose-regulated protein, 78kDa)
source : human
Total score : 227

1 0 5

Peptides matched : 8
データベース上の同定番号 : gi | 16507237
Sequence coverage : 21%

(3) タンパク質名 : heat shock 70kDa protein 8 isoform 2
source : human
Total score : 192
Peptides matched : 5
データベース上の同定番号 : gi | 24234686
Sequence coverage : 20%

(4) タンパク質名 : heat shock 70kDa protein 9B precursor
source : human
Total score : 182
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 24234688
Sequence coverage : 6%

(16) タンパク質名 : fatty-acid-Coenzyme A ligase,
long-chain 3
source : human
Total score : 64
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 27469830
Sequence coverage : 6%

(21) タンパク質名 : NADH dehydrogenase (ubiquinone)
Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q
reductase)

1 0 6

source : human
Total score : 55
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 4826856
Sequence coverage : 3%

バンド3

(NCBIInr (all entries)) score 47 を超えるものは有意

(4) タンパク質名 : S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1
source (organism) : human
Total score : 100
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 21361647
Sequence coverage : 11%

(5) タンパク質名 : chaperonin GroEL
source (organism) : Escherichia coli 0157
Total score : 91
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 15834378
Sequence coverage : 11%

(6) タンパク質名 : programmed cell death 8 isoform 1
source (organism) : human
Total score : 78
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 4757732
Sequence coverage : 5%

1 0 7

- (8) タンパク質名 : 60 kDa heat shock protein,
mitochondrial precursor
source (organism) : human
Total score : 66
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 129379
Sequence coverage : 3%
- (9) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F1 complex, alpha subunit,
isoform 1, cardiac muscle
source (organism) : human
Total score : 61
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 4757810
Sequence coverage : 2%
- (10) タンパク質名 : ribophorin II precursor
source (organism) : human
Total score : 55
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 88567
Sequence coverage : 10%

バンド5

[NCBI nr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : farnesyl-diphosphate farnesyltransferase

1 0 8

1

source : human
Total score : 345
Peptides matched : 6
データベース上の同定番号 : gi | 4758350
Sequence coverage : 18%

(2) タンパク質名 : Ubiquinol-cytochrome C reductase complex
core protein 2, mitochondrial precursor

source : human
Total score : 222
Peptides matched : 6
データベース上の同定番号 : gi | 21903482
Sequence coverage : 17%

(3) タンパク質名 : dolichyl-diphosphooligosaccharide-
protein glycosyltransferase

source : human
Total score : 158
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 21104416
Sequence coverage : 19%

(4) タンパク質名 : calcium-binding transporter

source : human
Total score : 83
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 6841066
Sequence coverage : 6%

1 0 9

- (5) タンパク質名 : NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S
protein 2 precursor
source : human
Total score : 71
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 3540239
Sequence coverage : 8%
- (6) タンパク質名 : actin, beta
source : human
Total score : 57
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 14250401
Sequence coverage : 18%
- (10) タンパク質名 : translation elongation factor EF-Tu-like
protein P43 precursor, mitochondrial
source : human
Total score : 47
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 7443384
Sequence coverage : 3%

バンド 6

[NCBI nr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : actin, beta
source (organism) : human

1 1 0

Total score : 306
Peptides matched : 12
データベース上の同定番号 : gi | 14250401
Sequence coverage : 45%

(4) タンパク質名 : galectin 9, short isoform
source (organism) : human
Total score : 245
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 4504987
Sequence coverage : 15%

(16) タンパク質名 : GSTmFra2/2-327
source (organism) : Expression vector pGH/F2.2-327
Total score : 139
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 3002516
Sequence coverage : 13%

(24) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F1 complex, alpha subunit,
isoform 1, cardiac muscle
source (organism) : human
Total score : 103
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 4757810
Sequence coverage : 2%

バンド 7

1 1 1

[NCBIInr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : metaxin 1
source : human
Total score : 63
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 4505281
Sequence coverage : 4%
- (2) タンパク質名 : sideroflexin 1
source : human
Total score : 62
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 23618867
Sequence coverage : 9%
- (3) タンパク質名 : TCR beta chain
source : human
Total score : 60
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 2982508
Sequence coverage : 5%
- (4) タンパク質名 : Hnrnp A1
source : human
Total score : 55
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 2194069
Sequence coverage : 8%

1 1 2

バンド 8

[NCBI nr (all entries)] score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : phosphate carrier precursor isoform 1b
source : human
Total score : 222
Peptides matched : 8
データベース上の同定番号 : gi | 4505775
Sequence coverage : 31%
- (2) タンパク質名 : sideroflexin 1
source : human
Total score : 204
Peptides matched : 5
データベース上の同定番号 : gi | 23618867
Sequence coverage : 24%
- (3) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F1 complex,
gamma polypeptide 1
source : human
Total score : 112
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 4885079
Sequence coverage : 8%
- (4) タンパク質名 : voltage-dependent anion channel 1
source : human

1 1 3

Total score : 65
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 4507879
Sequence coverage : 10%

(5) タンパク質名 : hyaluronan-binding protein precursor
source : human
Total score : 62
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 8699626
Sequence coverage : 19%

(6) タンパク質名 : androgen-regulated short-chain
dehydrogenase/reductase 1
source : human
Total score : 58
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 20070798
Sequence coverage : 4%

(7) タンパク質名 : solute carrier family 25
(mitochondrial carrier; oxoglutarate
carrier), member 11
source : human
Total score : 55
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 21361114
Sequence coverage : 11%

1 1 4

- (8) タンパク質名 : 3-hydroxybutyrate dehydrogenase
precursor
source : human
Total score : 52
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 17738292
Sequence coverage : 4%
- (9) タンパク質名 : B-cell receptor associated protein
source : human
Total score : 49
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 1673514
Sequence coverage : 8%

バンド 9

(NCBIInr (all entries)) score 47 を超えるものは有意

- (1) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F1 complex, O subunit
source : human
Total score : 255
Peptides matched : 7
データベース上の同定番号 : gi | 4502303
Sequence coverage : 39%
- (2) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F0 complex, subunit d
source : human

1 1 5

Total score : 217
Peptides matched : 8
データベース上の同定番号 : gi | 5453559
Sequence coverage : 55%

(3) タンパク質名 : ATP synthase, H⁺ transporting,
mitochondrial F0 complex, subunit b,
isoform 1
source : human
Total score : 139
Peptides matched : 4
データベース上の同定番号 : gi | 21361565
Sequence coverage : 24%

(4) タンパク質名 : small GTP-binding protein
source : human
Total score : 111
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 13569962
Sequence coverage : 15%

(6) タンパク質名 : NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S
protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q
reductase)
source : human
Total score : 79
Peptides matched : 2
データベース上の同定番号 : gi | 4505371
Sequence coverage : 28%

1 1 6

(7) タンパク質名 : vesicle trafficking protein sec22b
source : human
Total score : 76
Peptides matched : 1
データベース上の同定番号 : gi | 4759086
Sequence coverage : 6%

バンド11

(NCBI nr (all entries)) score 46 を超えるものは有意

(1) タンパク質名 : mitochondrial import receptor Tom22
source : human
Total score : 223
Peptides matched : 7
データベース上の同定番号 : gi | 9910382
Sequence coverage : 51%

(2) タンパク質名 : signal sequence receptor, delta
source : human
Total score : 159
Peptides matched : 3
データベース上の同定番号 : gi | 5454090
Sequence coverage : 19%

内部配列解析の結果バンド

A+B タンパク質名 ATP synthase, alpha chain
Peptides matched 5

1 1 7

| | | |
|----|-------------------|---|
| | 添付データ | gi 114517 or P25705 |
| | Sequence coverage | 10.13 % |
| C | タンパク質名 | ATP synthase, beta chain |
| | Peptides matched | 4 |
| | 添付データ | gi 114549 or P06576 |
| | Sequence coverage | 8.13 % |
| | タンパク質名 | Sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain |
| | Peptides matched | 1 |
| | 添付データ | gi 1703470 or P54709 |
| | Sequence coverage | 3.23 % |
| D | タンパク質名 | ADP, ATP carrier protein |
| | Peptides matched | 4 |
| | 添付データ | gi 113463 or P12236 gi 113459 or P05141 gi 113455 or P12235 |
| | Sequence coverage | 14.43 % |
| 4 | タンパク質名 | ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 1 |
| | Peptides matched | 1 |
| | 添付データ | gi 731047 or P31930 |
| | Sequence coverage | 2.29 % |
| 10 | タンパク質名 | Cytochrome c oxidase polypeptide II |
| | Peptides matched | 1 |

1 1 8

添付データ gi | 117020 | or P00403
Sequence coverage 2.64 %

上記で同定された候補ガレクチン9 結合分子は、さらに以下のようにしてガレクチン9 との相互作用につき解析し、最もガレクチン9 結合分子として適切なものを同定することができ、さらにその機能についても解析し明らかにすることができる。

① 免疫沈降法

ガレクチン9 を加えて細胞と反応させた後、細胞を溶解処理し、細胞抽出液を調製する。細胞内にガレクチン9 と結合する物質が存在すると、ガレクチン9 と結合した状態で細胞抽出液中に存在することとなる。得られた細胞抽出液にゲルなどを付けた抗ガレクチン9 抗体を反応させて、抗ガレクチン9 抗体を結合させる。あるいは抗ガレクチン9 抗体にプロテインAなどを結合させておいて、遠心分離処理して抗体と一緒にガレクチン9 を沈降させる。この際、ガレクチン9 に結合するタンパク質が存在すると抗体とともに沈降してくるため、同定することができる。沈降物は適宜洗滌処置されたり、場合により変性され、例えばSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、必要に応じて膜に転写するなどした後、ウェスタンブロッティングにより検知することができる。

② ウェストウェスタン法またはファーウェスタン法 (リガンドブロッティング法を含む)

1. 細胞タンパク質抽出液を電気泳動して、膜（P V D F等）にトランスファーする。
2. ガレクチン9 を標識して、膜上のタンパク質と特異的に結合させる。
3. 標識を検出することによりガレクチン9 の結合するタンパク質の分布がわかる（任意の組織に由来する細胞を用いることでどの組織に結合タンパク質が存在するか否かがわかる）し、局在（細胞質、細胞膜等の分画を用いる）、分子量がわかる。

なお、ガレクチン9 の標識には、公知の手法が制限無く使用できるが、例えば

以下の方法がある。

- A. ^{125}I や ^3H 等のRIで検出する。
- B. Biotinで標識し、Streptavidin結合抗体で検出する。
- C. 蛍光物質で標識し、その励起光または発色光を検出する。
- D. ガレクチン9をリン酸化標識し、抗リン酸化抗体で検出する。
- E. ガレクチン9に Tag (Flag、His、GST 等) を融合させ、Tag に対する抗体で検出する。

③分子間架橋法

- 1. ガレクチン9を培養細胞に添加した後、化学架橋剤を加えガレクチン9と標的タンパク質との結合を補強する。
- 2. 細胞を溶解し、得られたタンパク質抽出液よりSDS-PAGEでガレクチン9結合タンパク質を分離する。
- 3. 標的タンパク質の検出は抗ガレクチン9抗体を用いてウェスタンブロッティングや免疫沈降法等で行う。

④発現クローニング法

- 1. 大腸菌での発現クローニング法
 - a. 大腸菌を用いて候補となるタンパク質を発現させる。
 - b. 候補タンパク質を発現する大腸菌組換え体を溶解し、タンパク質抽出液を調製する。
 - c. 大腸菌の細胞抽出液を電気泳動して、ウェストウェスタン法または抗ガレクチン9抗体により検出する。検出のための標識方法は上記ウェストウェスタン法と同様なものが使用できる。
- 2. 大腸菌とファージを用いた発現クローニング法
 - a. 大腸菌に任意のタンパク質を発現するファージ（ファージライブラリー）を感染させる。
 - b. ファージ組換え体をニトロセルロース膜に移し、タンパク質を発現させる。

1 2 0

c. 標識したガレクチン9をニトロセルロース膜上に添加して、結合するタンパク質を発現したファージ組換え体を同定する。

d. ファージ組換え体からガレクチン9と結合するタンパク質のcDNAがわかる。

3. 培養細胞での発現クローニング法

a. 培養細胞に候補となるタンパク質のcDNAを導入し、候補タンパク質を発現させる。

b. ガレクチン9を培養細胞に添加して培養後、非特異的に結合するガレクチン9を除くため細胞を洗浄する。

c. 蛍光物質または発色剤で標識したガレクチン9を反応させ、ガレクチン9が発現させたタンパク質と結合しているかをELISA、またはFACS（蛍光や発光物質を読み取る方法及び機械・装置）で検出する。

⑤ Two-Hybrid system

本システムは、レポーター遺伝子の転写活性を指標に2つのタンパク質間の相互作用を、酵母内で検出するものである。本法の特徴は、酵母生体内(in vivo)でタンパク質間の相互作用の検出を行うことができ、弱い一時的な相互作用も検出できる高感度なアッセイを行える点である。また、相互作用を検出する段階では、タンパク質の精製や抗体を必要としないという利点がある。

操作手順としては、

1. ガレクチン9遺伝子(bait)をDNA結合タンパク質(DNA-BD)と融合したものと、その遺伝子と相互作用すると考えられる候補タンパク質をコードする遺伝子(pre)を転写活性化遺伝子(DNA-AD)と融合させたものの双方を、酵母内で発現させる。

2. 転写活性を検出するレポーター遺伝子は酵母の染色体中に組み込んであり、様々なものが開発され利用されているが、そうしたものは制限なくそれを利用できる。該レポーター遺伝子は、通常栄養性機能遺伝子やlacZ遺伝子が用いられる。

3. 酵母細胞内でガレクチン9(bait)と候補タンパク質(pre)が相互作用をした

場合のみ、融合させた転写活性化遺伝子が機能し、レポーター遺伝子上流の転写が活性化され、標的遺伝子を発現させる。

4. 実際には、培地プレート上での栄養要求性の回復や、 β ガラクトシダーゼ活性の測定により、相互作用を検出する。つまり、相互作用した場合に酵母細胞が増殖し、それ以外では酵母が増えない培地条件にしておいたり、 β ガラクトシダーゼにより発色することにより検出する。

また、2つのタンパク質間の相互作用を、酵母内で検出するシステムの他に、哺乳類細胞を用いるシステムがある。こうしたシステムもそれを制限なく使用できる。

⑥ファージディスプレイ法

ファージディスプレイは、他の分子と相互作用のあるタンパク質やペプチドを同定するために用いられる。

手順としては、

1. バクテリオファージゲノムにDNA を挿入し、ファージのキューピッドタンパク質（ファージDNA を覆う表面タンパク質）に融合した状態で候補となるタンパク質をファージ分子の表面に提示させる。
2. ファージをプレートの表面にコートしたガレクチン9 と反応させる。ガレクチン9 と非特異的に結合するファージ組換え体（タンパク質を発現したファージ）を洗い流す。
3. 上記操作を繰り返し、任意のファージ組換え体の候補の中からガレクチン9 と特異的相互作用を持つ候補の分子を発現するファージのみを選択し濃縮する。
4. 選抜されたファージから発現しているタンパク質のcDNAが調製できるので、遺伝子、タンパク質ともに同定できる。
5. 選抜の際に、さらにガレクチン9 をコートした96穴プレートと相互作用するファージを用いてELISA を行い、より強く結合するタンパク質を発現したファージを発色の強さから選んでくることができる。

⑦表面プラズモン共鳴法について（BIAcore を用いた方法）

本Biacore の検出系は、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance = SPR) の光学現象を採用した手法である。かくして、2分子間の結合と解離に伴ってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化をSPR シグナルとして検出する。

本方法の原理は、生体分子の固定化されていない側のセンサーチップ（金薄膜）に光を全反射するように当てると、反射光の一部に、反射光強度が低下した部分が観察される（SPR シグナル発生）。この光の暗い部分の現れる角度（＝屈折率の変化）は、センサーチップ上での質量に依存する。

センサーチップ表面のガレクチン9（リガンド）に候補タンパク質（アナライト）を添加し結合反応が起きると、質量変化（＝質量増）が生じ、光の暗い部分がIからIIにシフトします。1mm²あたり1ng の物質が結合するとI→IIに0.1 度シフトすることが知られている。逆に、解離により質量が減少すれば、II→Iにその分だけ戻ることとなる。

Biacore では、IからIIにシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。縦軸の単位は、Resonance Unit (=RU レゾナンスユニット) で表され、1RU = 1pg/mm² に相当する。

生体分子標識することなく、相互作用をリアルタイムで見ることができる。

手順としては、

1. ガレクチン9（リガンドと呼ぶ）をセンサーチップに固定化する。
2. 作用すると思われる候補タンパク質（アナライトと呼ぶ）を含む溶液をセンサーチップ上に一定の流速で送液する。
3. ガレクチン9と候補タンパク質の結合と解離が起こると、そのシグナルが表面プラズモン共鳴として検出される。
4. 結合の強さがシグナルの強弱により定量できるので、ガレクチン9とより強い相互作用のあるタンパク質が同定できる。

⑧蛍光偏光法

蛍光偏光法は溶液中における糖鎖－タンパク質、抗原－抗体あるいはタンパク質間相互作用を固定化やトレーサー分子の分離作業をすることなく、その相互作

用を直接分析することができる。

本蛍光偏光法の原理は、液体中の蛍光標識したガレクチン9分子が平面偏光により励起されると、同一平面に偏光蛍光を発する。しかし励起状態中にブラウン運動により回転すると励起平面と異なる平面へ蛍光を発し蛍光偏光が解消される。つまり蛍光偏光度とは励起されてから蛍光を発するまでの間に蛍光性分子が回転する度合いを表すこととなる。一般に蛍光性プローブにより標識された小さな分子は溶液中でブラウン運動により激しく回転するため低い偏光度を示す。一方、他のタンパク質分子が結合すると溶液中におけるブラウン運動は減少し、偏光度は上昇する。よって蛍光偏光法では偏光度の変化を指標として溶液中におけるタンパク質間相互作用を解析することが可能となる。

手順としては、

1. 蛍光標識したガレクチン9の蛍光偏光度を測定する。
2. 他のタンパク質の溶液を加え、結合により蛍光標識したガレクチン9の発する蛍光偏光度が変化するかどうか検出する。
3. より大きく偏光度が変化する場合に、候補となるタンパク質の結合が起こったものとして、相互作用するタンパク質の同定を行うもの。

以上のようにして、同定されたガレクチン9結合分子は、それを利用して本明細書に開示の技術にしたがい、それを制御する物質の検索に利用できる。

産業上の利用可能性

本発明により、ヒトガレクチン9が腫瘍細胞に対して細胞傷害活性やアポトーシス誘導活性を示すが、正常細胞には傷害活性を示さず、さらにはアポトーシスを誘導しないことから、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9アゴニスト、ガレクチン9アンタゴニスト拮抗物質、抗ガレクチン9結合蛋白抗体、抗ガレクチン9結合糖鎖抗体、ガレクチン9産生・遊離誘導物質などを、正常細胞には作用しない、腫瘍細胞に傷害活性を示し、アポトーシスを誘導する抗腫瘍剤（抗ガン剤）として利用する技術の開発が可能となった。

さらに、ヒトガレクチン9は非活性化（レスティング）T細胞、特にCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）のアポトーシス誘導はしないのに対して活性化したC

D4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）のアポトーシス誘導を著明に誘導し、活性化CD8陽性T細胞（サブレッサーT細胞や細胞傷害性T細胞）のアポトーシスもガレクチン1やガレクチン3よりも強く誘導すること、並びにグルココルチコイド（デキサメサゾン）と同様、受容体→カルシウム流入→カルパイン→カスパーゼ1→カスパーゼ3及び7という経路でアポトーシスを誘導すると考えられ、ガレクチン9が抗炎症薬、抗アレルギー剤や免疫抑制薬として使用でき、ガレクチン9タンパク質、ガレクチン9遺伝子導入やガレクチン9を誘導することにより副作用の少ない免疫抑制剤として用いること、またはそれを併用することでグルココルチコイド等の用量を減ずる結果、副作用を少なくすることもできる。かくして、ガレクチン9、その類縁体などの利用、ガレクチン9の生体内濃度、あるいは発現をコントロールすることで、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用活性成分剤を提供できる。また、ガレクチン9を利用して、グルココルチコイドの示す薬理作用・生物活性を利用した分野への応用が可能である。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

請 求 の 範 囲

1. (i) (a) ガレクチン9及びその類縁体、
(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
(c) ガレクチン9産生及び遊離の誘導因子、
(d) 抗ガレクチン9受容体抗体、及び
(e) ガレクチン9結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする、
(ii) 抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用活性成分剤から成る群から選ばれた医薬又は動物薬。

2. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

3. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤。

4. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫抑制剤。

5. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする自己免疫疾患用剤。

6. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする抗炎症剤。

7. ガレクチン9又はその類縁体ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする副腎皮質ステロイドホルモン代替剤。

8. (a) ガレクチン9及びその類縁体、及び(b) ガレクチン9及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする悪性細胞傷害剤。

9. (a) ガレクチン9 及びその類縁体、及び(b) ガレクチン9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とするガン転移抑制剤。

10. (i) (a) ガレクチン9 及びその類縁体、
(b) ガレクチン9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
(c) ガレクチン9 産生及び遊離の誘導因子、
(d) 抗ガレクチン9 受容体抗体、及び
(e) ガレクチン9 結合性糖鎖に対する抗体
から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示す薬剤。

11. (i) (a) ガレクチン9 及びその類縁体、
(b) ガレクチン9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
(c) ガレクチン9 産生及び遊離の誘導因子、
(d) 抗ガレクチン9 受容体抗体、及び
(e) ガレクチン9 結合性糖鎖に対する抗体
から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導する薬剤。

12. (i) (a) ガレクチン9 及びその類縁体、
(b) ガレクチン9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
(c) ガレクチン9 産生及び遊離の誘導因子、
(d) 抗ガレクチン9 受容体抗体、及び
(e) ガレクチン9 結合性糖鎖に対する抗体
から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする免疫細胞、例えば活性化T細胞に対してアポトーシスを誘導する薬剤。

13. (i) (a) ガレクチン9 及びその類縁体、

- (b) ガレクチン 9 及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、
- (c) ガレクチン 9 産生及び遊離の誘導因子、
- (d) 抗ガレクチン 9 受容体抗体、及び
- (e) ガレクチン 9 結合性糖鎖に対する抗体

から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする活性化T細胞に起因する疾患あるいは病的症状の予防及び／又は治療剤。

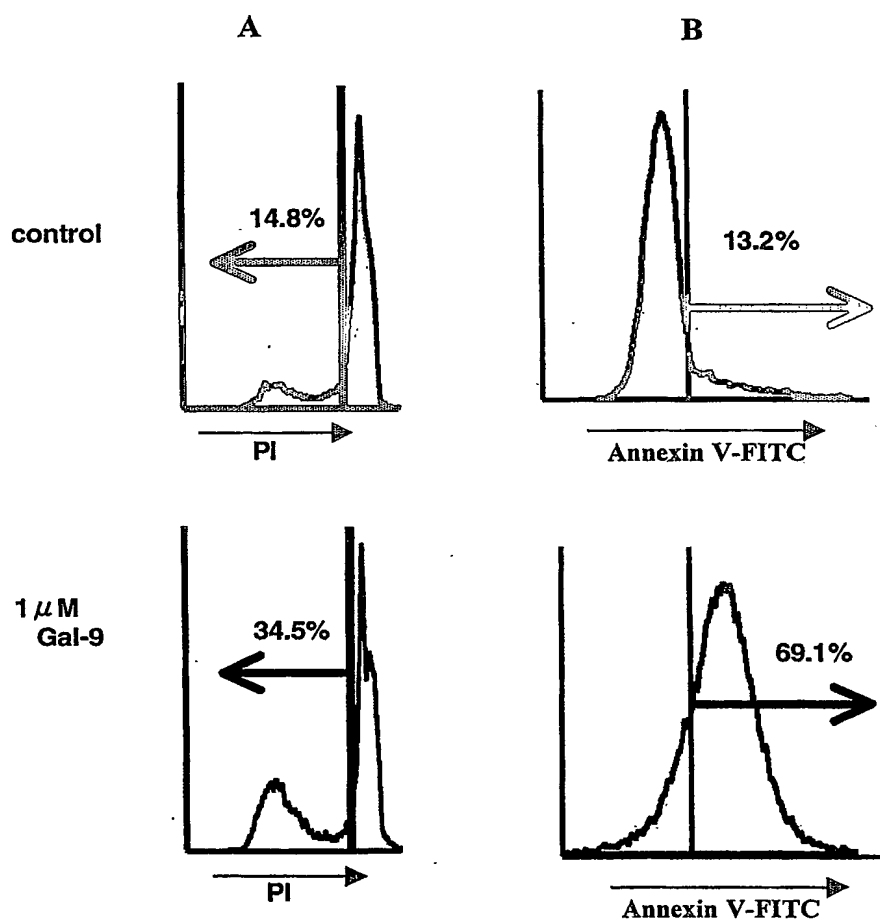
14. 4F2 heavy chain antigen (177216); ATPase, Na⁺ /K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (21361181); sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2 truncated isoform (15004317); stromal cell derived factor receptor 1 isoform a (9257240); stromal cell derived factor receptor 1 isoform b; heat shock 90kDa protein 1, beta (20149594); heat shock 90kDa protein 1, alpha; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (16507237); heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 (24234686); heat shock 70kDa protein 9B precursor (24234688); fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3 (27469830); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4826856); S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (21361647); programmed cell death 8 isoform 1 (4757732); 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (129379); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle (4757810); ribophorin II precursor (88567); farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (4758350); Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (21903482); dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (21104416); calcium-binding transporter (6841066); NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S protein 2 precursor (3540239); actin, beta (14250401); translation elongation factor EF-Tu-like protein P43 precursor, mitochondrial (7443384); metaxin 1 (4505281); sideroflexin 1 (23618867); TCR beta chain (298250

8); Hnrnp A1 (2194069); phosphate carrier precursor isoform 1b (4505775); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 (4885079); voltage-dependent anion channel 1 (4507879); hyaluronan-binding protein precursor (8699626); androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 (20070798); solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11 (21361114); 3-hydroxybutyrate dehydrogenase precursor (17738292); B-cell receptor associated protein (1673514); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (4502303); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d (5453559); ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 (21361565); small GTP-binding protein (13569962); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (4505371); vesicle trafficking protein sec22b (4759086); mitochondrial import receptor Tom22 (9910382); signal sequence receptor, delta (5454090); ATP synthase, alpha chain (114517 or P25705); ATP synthase, beta chain (114549 or P06576); Sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain (1703470 or P54709); ADP, ATP carrier protein (113463, P12236, 113459, P05141, 113455 or P12235); ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 1 (731047 or P31930)及びCytochrome c oxidase polypeptide II (117020 or P00403)から成る群から選ばれたものであることを特徴とするガレクチン9結合因子〔括弧内の数字は、NCBIのインターネットホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)にてその数字を入力することにより、タンパク質情報並びにそれをコードするDNAなどの核酸配列の情報を得ることができる、データベース上の同定番号をさす〕。

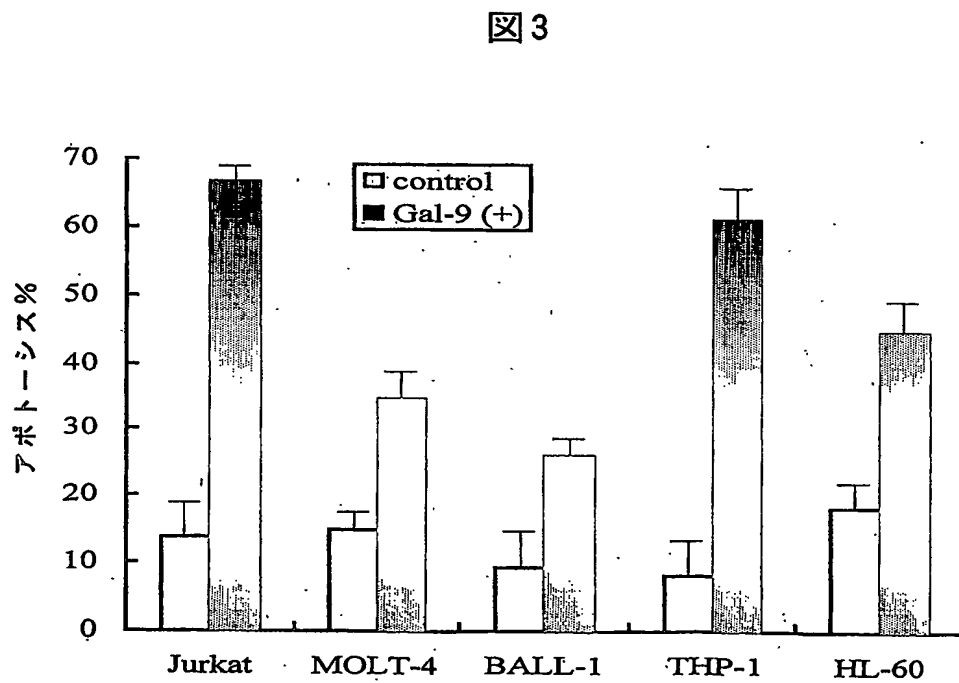
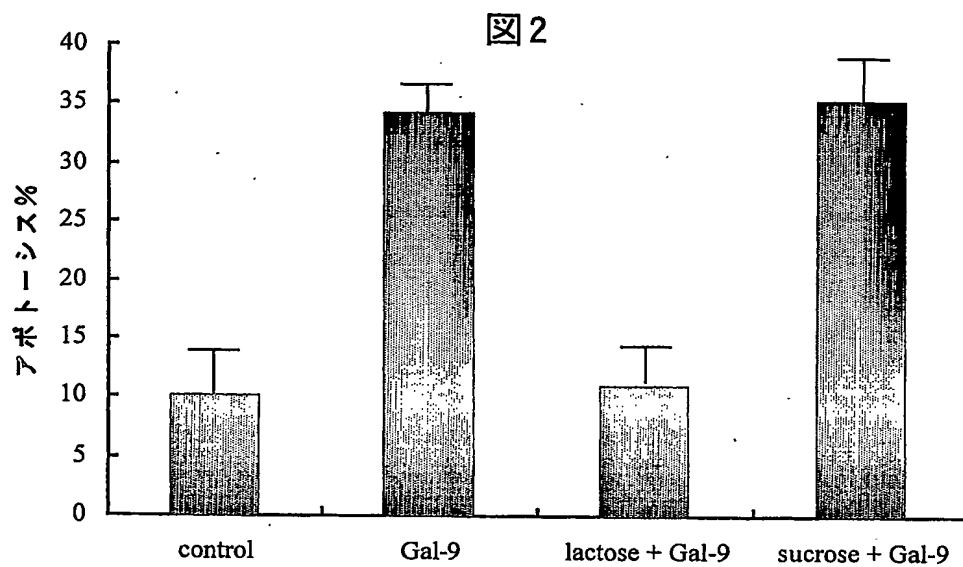
15. 請求項14記載のガレクチン9結合因子とガレクチン9との間の相互作用を利用したガレクチン9活性制御技術。

1 / 1 2

図 1



2 / 1 2



3 / 1 2

図 4

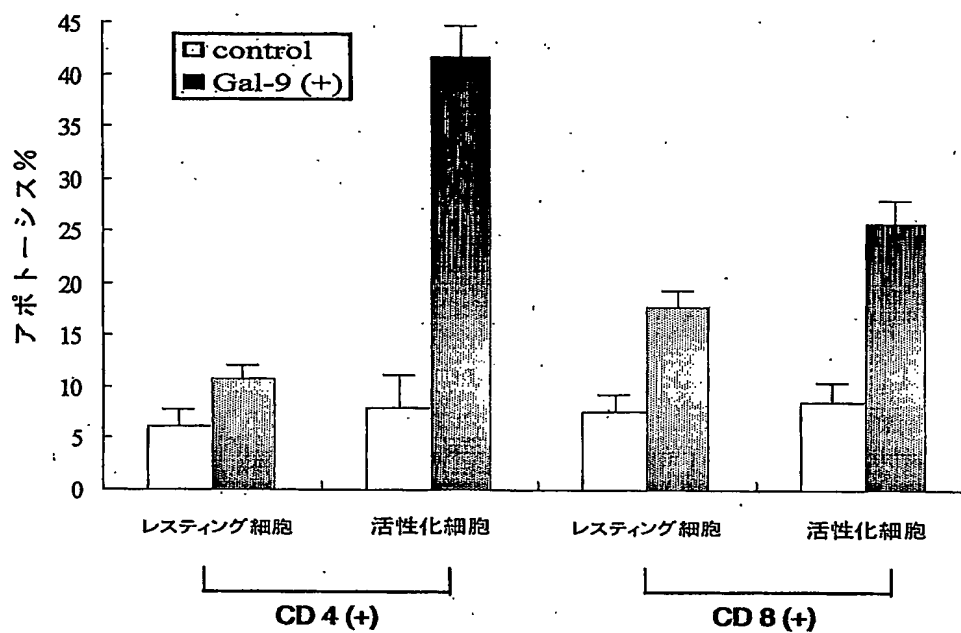
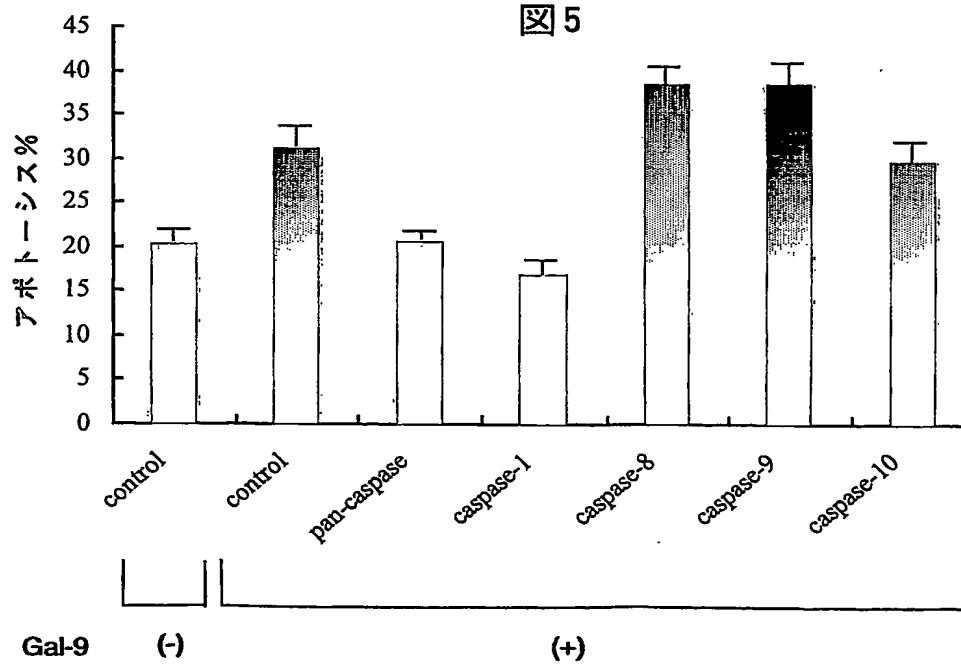
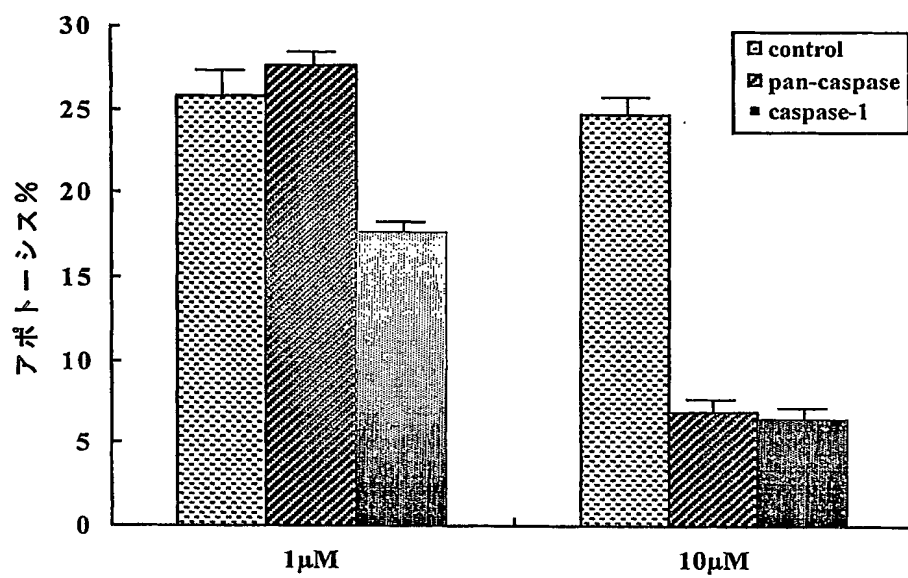


図 5



4 / 1 2

図 6



5 / 1 2

図 7

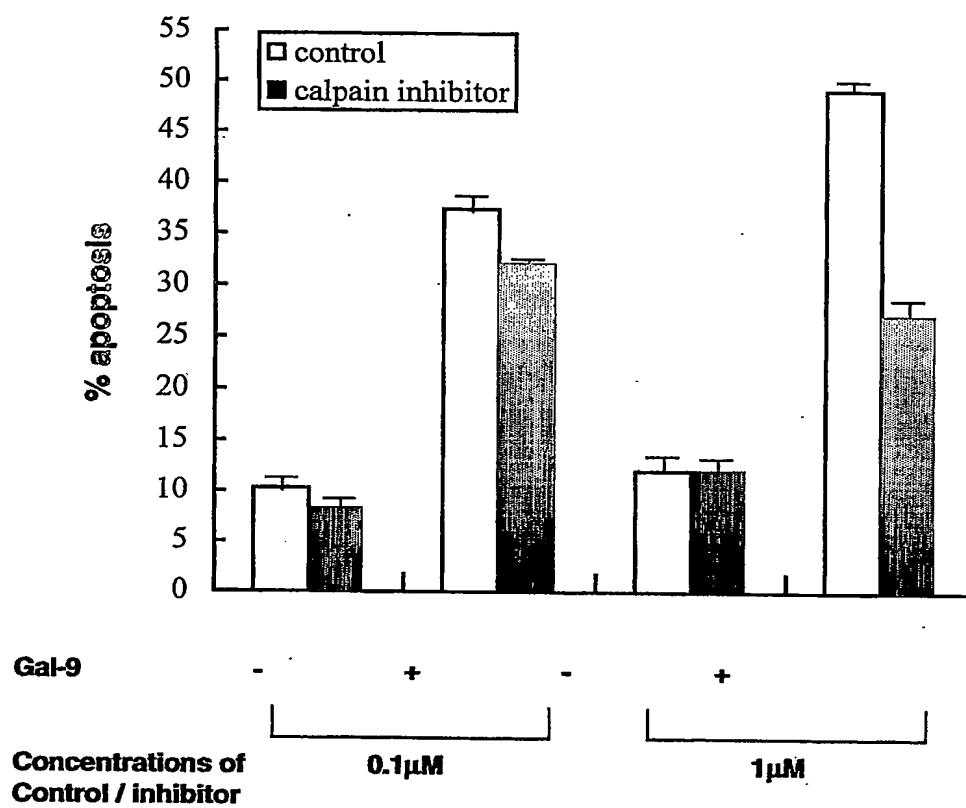
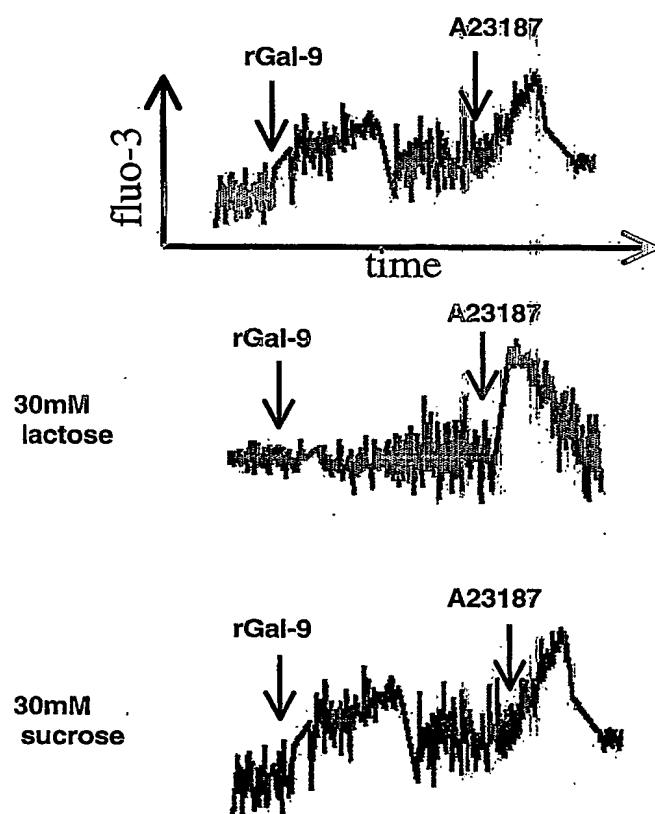
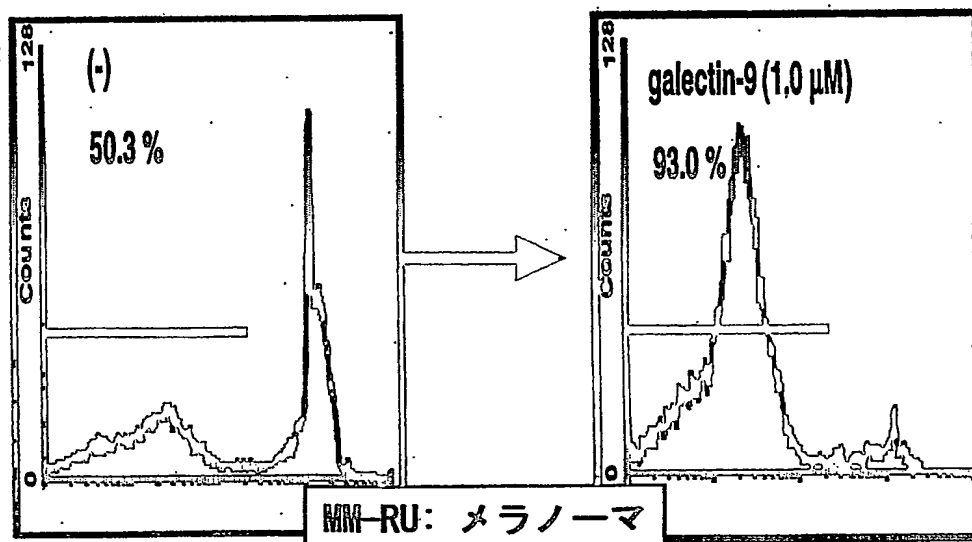
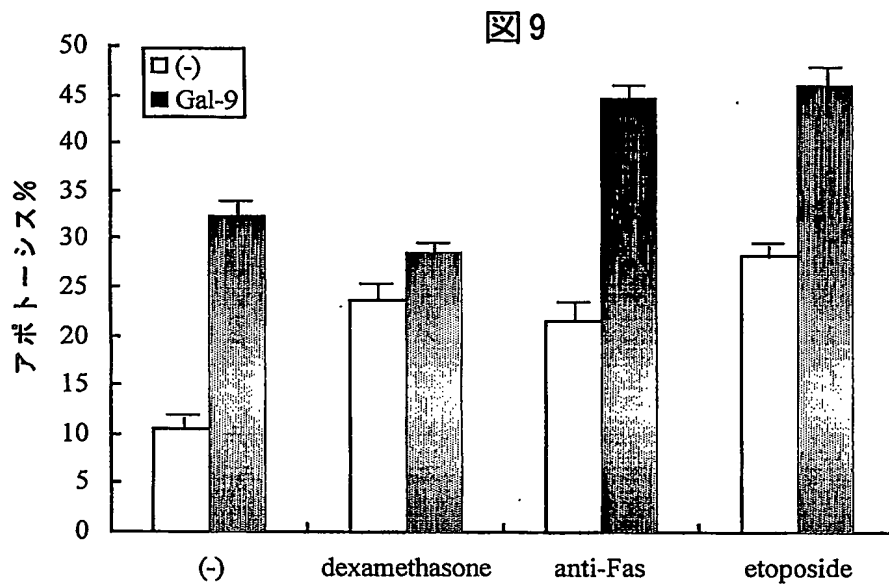


図 8



7 / 1 2



72時間培養

図 1 0

8 / 1 2

図 1 1

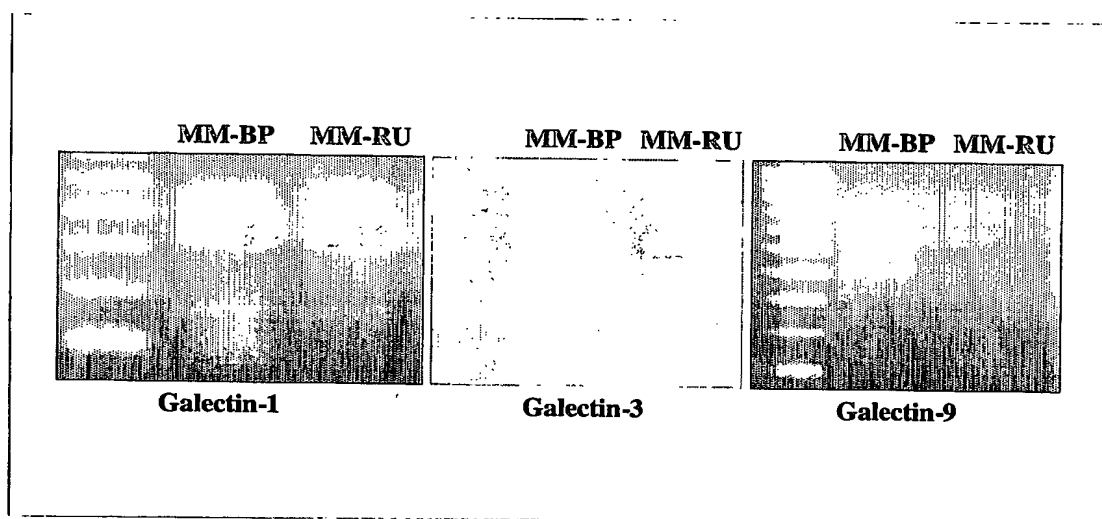


図12

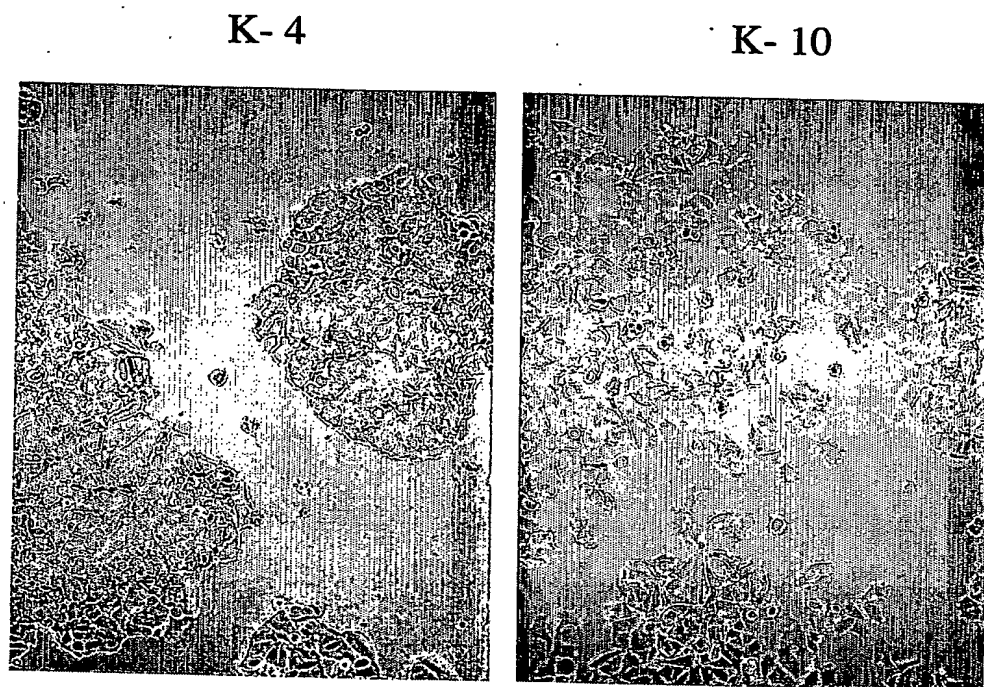
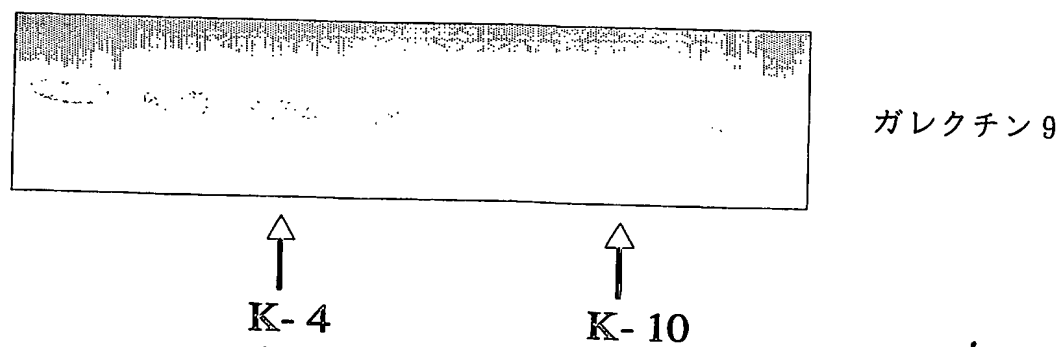
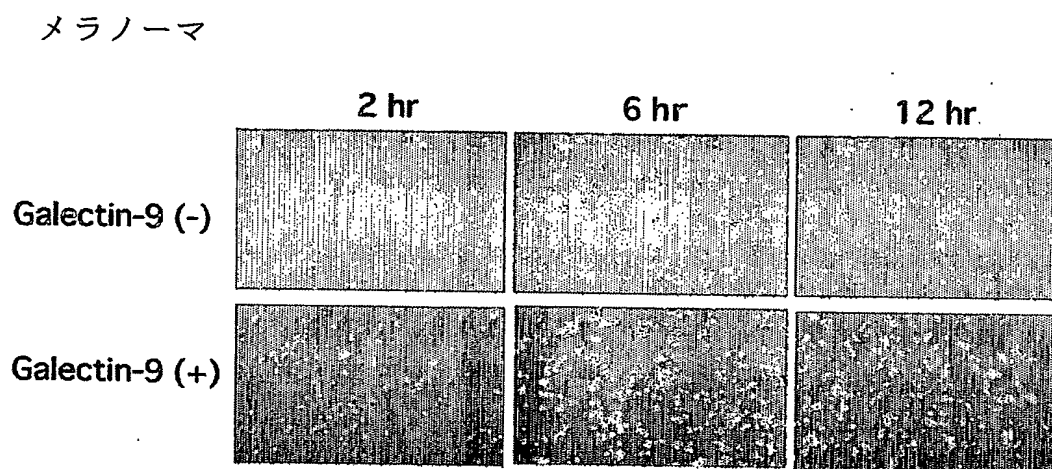


図13



1 0 / 1 2

図1 4



1 1 / 1 2

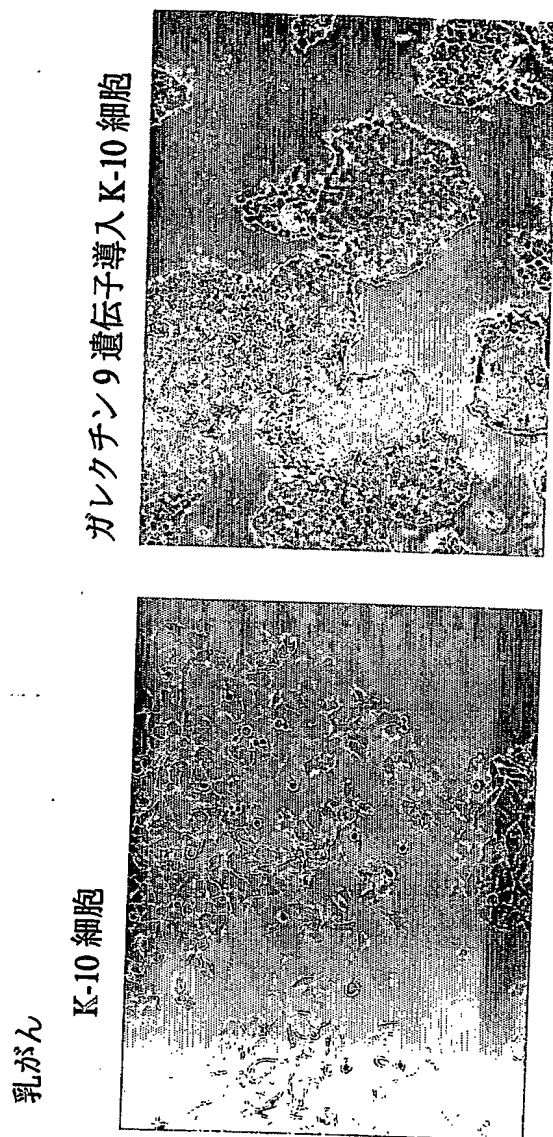


図 1' 5

1 2 / 1 2

図 1 6

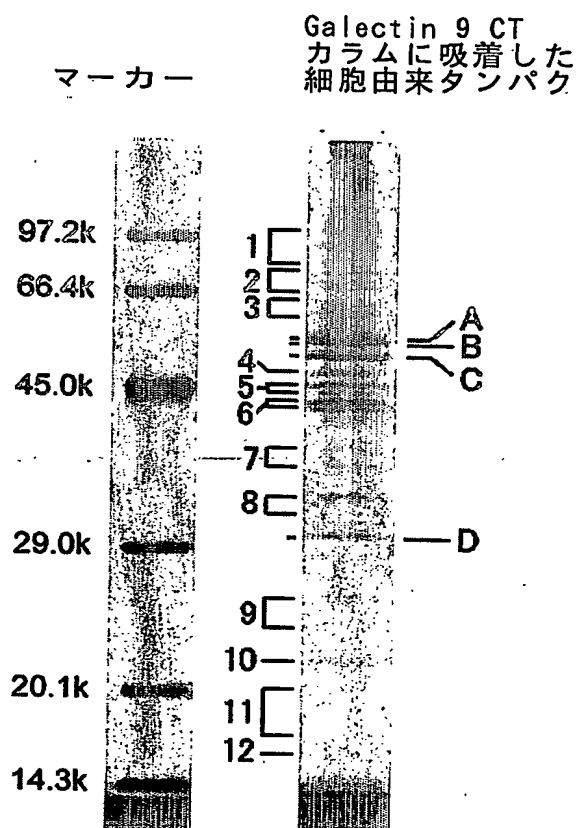


図12

K-4

K-10

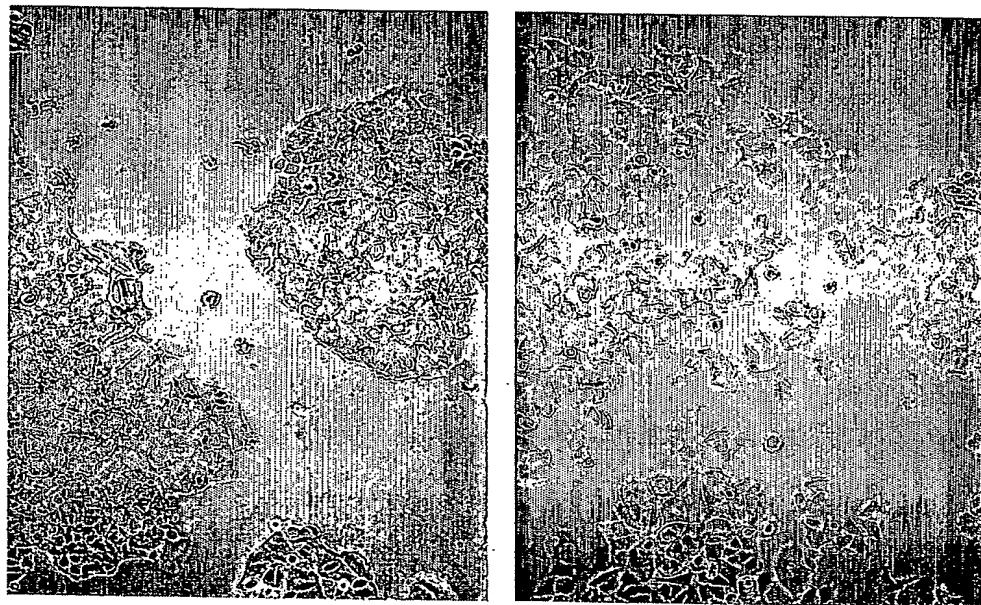
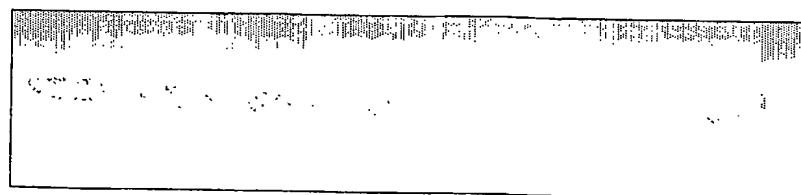


図13



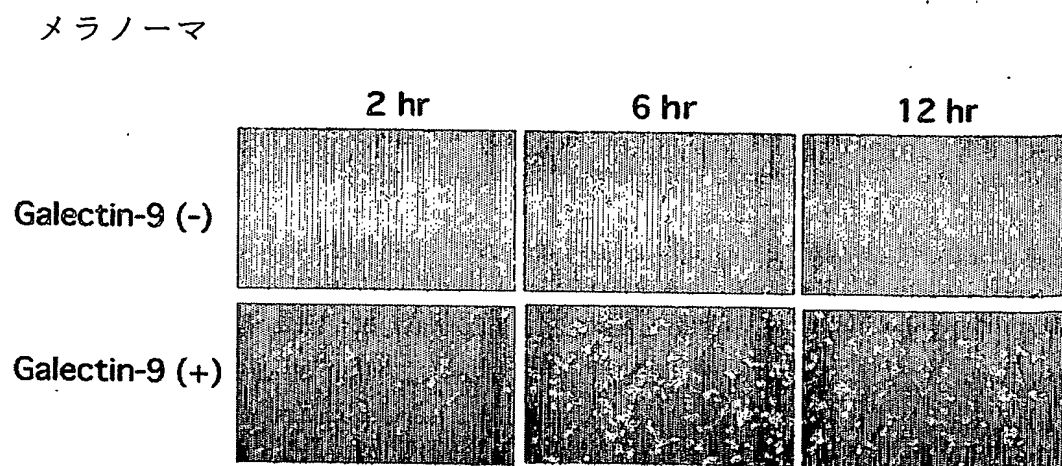
ガレクチン9

↑
K-4

↑
K-10

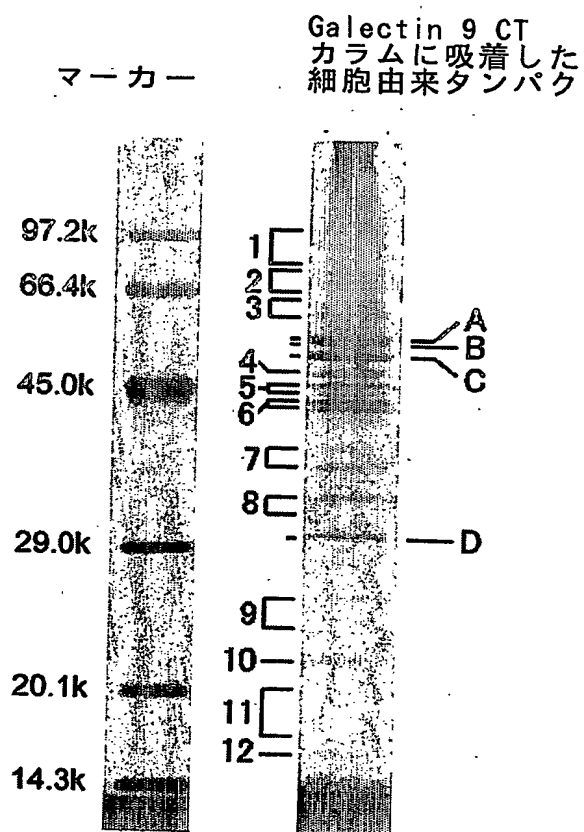
1 0 / 1 2

図 1 4



1 2 / 1 2

図16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P5/38, 29/00, 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P5/38, 29/00, 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1926-1992 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-1996 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-1992 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2003 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | LEFFLER, Hakon et al., Introduction to galectins, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1997, Nos.9, 45, pages 9 to 19 | 1-13 |
| X | WO 98/15624 A1 (Human Genome Sciences, Inc.), 16 April, 1998 (16.04.98), Full text & JP 2001-501831 A & EP 1012266 A1 | 1-13 |
| X | WO 02/89831 A1 (Protojien Kabushiki Kaisha), 14 November, 2002 (14.11.02), Full text & JP 2002-322082 A | 1-13 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|--|---|
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|--|---|

Date of the actual completion of the international search
01 December, 2003 (01.12.03)

Date of mailing of the international search report
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10587

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO 99/10490 A1 (Protojileen Kabushiki Kaisha), 04 March, 1999 (04.03.99), Full text & JP 2001-522581 A & EP 1005548 A1 | 1-13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10587

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although the various substances as set forth in claim 14 are common to each other in being a substance binding to galectin 9, such substances had been publicly known before the application of the present case (see, if necessary, the following document a) and thus the above point cannot be considered as a technical feature of the inventions according to this claim.

Such being the case, "4F2 heavy chain antigen", "ATPase, Na⁺/K⁺ transporting", etc. as set forth in claim 14 have technical features different from each other and it does not appear that there is a technical relationship among these 48 inventions involving one or more of the same or corresponding technical features. Similarly, it does not appear (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 13

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10587

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

that there is a technical relationship between the inventions of claim 14 and claim 1 involving one or more of the same or corresponding technical features.

Such being the case, it is recognized that the present international application does not comply with the requirement of unity of invention.

Document a: SUK, Kyoungcho et al., Natural autoantibody to galectin-9 in normal human sera, Journal of Clinical Immunology, 1999, Vol.19, No.3, pages 158-165

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00,
A61P5/38, 29/00, 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00,
A61P5/38, 29/00, 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992
日本国公開実用新案公報 1971-1992
日本国登録実用新案公報 1994-1996
日本国実用新案登録公報 1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | LEFFLER, Hakon et al, Introduction to galectins, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1997, No. 9, No. 45, pages 9-19 | 1-13 |
| X | WO 98/15624 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 1998. 04. 16 全文 & JP 2001-501831 A & EP 1012266 A1 | 1-13 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 12. 03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岩下 直人

4C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3451



| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | WO 02/89831 A1 (Protojleen K. K.) 2002. 11. 14 全文 & JP 2002-322082 A | 1-13 |
| A | WO 99/10490 A1 (Protojleen K. K.) 1999. 03. 04 全文 & JP 2001-522581 A & EP 1005548 A1 | 1-13 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 15 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 14 に記載の種々の物質はガレクチン9 に結合する物質である点で共通しているが、その様な物質は本国際出願の出願前に公知である (必要であれば、下記文献aを参照) ので、この点は請求項に係る発明の技術的特徴足り得ない。

してみれば、請求項 14 に記載される「4F2 heavy chain antigen」, 「ATPase, Na⁺/K⁺ transporting」等の種々のものはそれぞれ相違する技術的特徴を有するものであり、これらの48の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係が存するものとは認められない。また、請求項 14 に記載される発明と請求項 1 に記載される発明についても一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係が存するものとは認められない。

よって、本国際出願は発明の単一性の要件を満たさないものと認められる。

文献a. SUK, Kyoung-ho et al, Natural autoantibody to galectin-9 in normal human sera, Journal of Clinical Immunology, 1999, Vol. 19, No. 3, pages 158-165

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-13

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。